

Berichte aus dem Institut für Meereskunde
an der Christian-Albrechts-Universität Kiel

Nr. 16

SCHWERMETALL-KONTAMINATION VON PHYTOPLANKTON
UNTER NATÜRLICHEN VERHÄLTNISSEN UND IN LABORKULTUREN
- Übersicht über die neuere Literatur -

von

Dieter Löbe
dipl.biol.

DOI 10.3289/IFM-BER-16

Kopien dieser Arbeit können bezogen werden von:

Walter Nellen
Institut für Meereskunde
Abt. Fischereiibologie
23 Kiel
Düsternbrooker Weg 20

Diese Arbeit wurde angefertigt im Rahmen des Zusammenarbeitsprogramms der Gesellschaft für Kernenergieverwertung in Schiffbau und Schifffahrt mbH (GKSS), Geesthacht, mit norddeutschen Hochschulen.

Einzelvorhaben 3213 97:

"Biologische Wirksamkeit hoher Konzentrationen von wasserlöslichen Schwermetallverbindungen auf aquatische Organismen".

Beihilfeempfänger: W. Nellen, J. Lenz
Institut für Meereskunde Kiel

Kiel, September 1975

Die „Berichte aus dem Institut für Meereskunde“ erscheinen in unregelmäßiger Folge und sind gedacht als Arbeitsunterlagen für den sich mit dem jeweiligen Thema befassenden Personenkreis. Die Hefte werden fortlaufend numeriert. Sie sind unredigierte Beiträge und geben allein die Meinung des Verfassers wieder.

D 23 Klei 1, Düsternbrooker Weg 22

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
<u>Teil A: Kontamination in der natürlichen Umwelt</u>	1
1. Essentielle Schwermetalle	1
2. Verteilung einiger Schwermetalle zwischen Organismus und Umgebung in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen	1
3. Adaption an Schwermetalle	4
4. Benthosalgen als Indikatoren für die Metallbelastung von Küstengewässern	6
<u>Teil B: Kontamination in Laborkultur-Experimenten</u>	8
1. Faktoren, die die Toxizität von Schwermetallen in Laborkulturen beeinflussen	8
1.1. Licht	8
1.2. Zusammensetzung des Kulturmediums	9
1.2.1. Chelatbildner als Toxizitätspuffer	9
1.2.2. Bodensedimente als Quelle mikrobieller Aktivität	11
1.2.3. pH und Salinität	11
2. Toxizität einzelner Schwermetalle und deren physiologische Ursachen	12
2.1. Kupfer	12
2.1.1. Einfluß auf das Wachstum (Zellteilung)	12
2.1.2. Bindung an die Zellwand und Verteilung	17
2.1.3. Einfluß auf die Photosynthese	18
2.1.4. Einfluß auf die Atmung	20
2.2. Quecksilber	20
2.2.1. Weltweite Verbreitung und Gefahr für aquatische Ökosysteme	20
2.2.2. Einfluß auf das Wachstum (Zellteilung)	22
2.2.3. Bindung an die Zellwand, Änderung der Permeabilität	23
2.2.4. Einfluß auf die Photosynthese	25
2.2.5. Biotransformation in eine flüchtige Form	26
2.3. Zink	27
2.3.1. Aufnahme und Toxizität	27
2.4. Kobalt	34
2.4.1. Aufnahme und Toxizität	34
2.5. Chrom	35
2.5.1. Einfluß auf Wachstum und Photosynthese	35
2.6. Nickel	36
2.6.1. Aufnahme in Abhängigkeit vom metabolischen Zustand	36
2.7. Arsen	37
2.7.1. Aufnahme und Austausch	37
3. Zusammenfassung/Abstract	39/41
4. Literatur-Zitate	43

Teil A: Kontamination in der natürlichen Umwelt

1. Essentielle Schwermetalle

Schwermetalle wie Eisen, Kobalt, Kupfer, Mangan und Zink sind essentielle Bestandteile eines jeden Lebewesens aufgrund ihrer katalytischen Funktion im enzymatischen Stoffwechselgeschehen. Unter ihnen ist quantitativ nur Fe als Mineralnährstoff bedeutungsvoll, alle anderen essentiellen Schwermetalle sind Spurenelemente. Eisen ist Bestandteil der funktional vielseitigen Porphyrine, Kobalt ist Baustein des Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂), Kupfer, Mangan und Zink sind weitverbreitete enzymgebundene Metallionen, die den Verlauf enzymatischer Katalysen entscheidend beeinflussen. Unter den Pflanzen benötigen die Algen als weitere essentielle Schwermetalle noch Molybdän und Vanadium. Obwohl die physiologische Bedeutung des Vanadiums noch nicht näher bekannt ist, sind die Ausfallerscheinungen bei Molybdänmangel schon eingehend untersucht. Die wichtigste Rolle im Zellstoffwechsel spielt Molybdän als Bestandteil der Nitratreduktase. Die Blaualge *Anabaena cylindrica* vermag bei Mo-Mangel zwar Nitrat aufzunehmen, jedoch nicht enzymatisch zu reduzieren, sodaß Amino-Stickstoff gebildet werden kann.

Einen Überblick über die Bedeutung der Spurenmetalle im Zellstoffwechsel gibt BOWEN (1966). Empirische Angaben zur Schwermetall-Supplementierung von Algenkulturmedien macht SOEDER et al. (1967).

2. Verteilung einiger Schwermetalle zwischen Organismus und Umgebung in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen

Bei der Untersuchung über die biochemische Zusammensetzung von marinem Phytoplankton (RILEY u. ROTH 1971, MAYZAUD u. MARTIN 1975) stellte sich heraus, daß die Elemente Fe und Zn gegenüber Co, Cu und Mn bei weitem den größten Teil der nachgewiesenen Schwermetalle ausmachen. Fe und Zn wurden in natürlichen Phytoplanktonproben in etwa 10fach höherer Konzentration als Cu und Mn gefunden, von Co konnten nur Spuren nachgewiesen werden (MAYZAUD u. MARTIN 1975). Phytoplanktonalgen besitzen die Fähigkeit, Schwermetalle viel stärker als z.B. Alkalimetalle aus dem umgebenden Seewasser anzureichern, wogegen die Zooplankter nur geringe Mengen von Schwermetallen direkt aus dem Wasser - z.B. durch Absorption an den Kiemenepithelien

aufnehmen und in ihren Körpern speichern. Es gibt jedoch Ausnahmen, wie z.B. manche dekapode Crustaceen, die Mangan und Zink um den Faktor $10^4 - 10^6$ gegenüber dem Meerwasser konzentrieren können (BRYAN, PRESTON u. TEMPLETON 1966). Meerestiere können ihren Schwermetallgehalt im Körper unabhängig von den Verhältnissen der Umgebung in einem bestimmten Bereich regulieren im Gegensatz zu Meerespflanzen, deren Schwermetallgehalt mehr oder weniger proportional zur Umweltkonzentration zu- oder abnimmt.

Obwohl Planktonalgen des Süß- und Salzwassers einige Schwermetalle aus dem Wasser um das 1000 - 10 000fache in ihren Zellen akkumulieren können, sind zumindest im küstenfernen marinen Bereich keine signifikanten Populationskalamitäten in situ beobachtet worden. Die Variation der Schwermetallkonzentrationen in Phyto- und Zooplankton auf den einzelnen Trophiestufen einer Nahrungskette scheint den allgemeinen Stoffwechsel der Organismen nicht wesentlich zu beeinflussen (KNAUER u. MARTIN 1973) und der Elementgehalt mariner Organismen variiert ohnehin speziesspezifisch in einer natürlichen Planktonpopulation in Abhängigkeit von der Qualität des umgebenden Wasserkörpers (FUJITA 1971). Zur Messung der Akkumulationsleistungen identischer Spezies aus verschiedenen Wasserregionen bezieht man sich auf den sogenannten Konzentrationsfaktor CF für das untersuchte Metall. $CF = \text{Metallkonzentration im Organismus (Naßgewicht)} / \text{Metallkonzentration im umgebenden Wasser}$ (BOWEN 1956).

Wie KNAUER u. MARTIN (1973) während ihrer Untersuchungen vor der kalifornischen Küste feststellen konnten, variiert der Schwermetallgehalt (Cd, Cu, Mn, Pb u. Zn) des küstennahen Oberflächenwassers jahreszeitlich stark, was primär auf hydrographische Faktoren wie vor allem Auftriebsbewegungen zurückgeführt werden konnte. Die Konzentrationen von Cu, Mn, Pb und Cd variierten im Bereich von 1 - 10 $\mu\text{g/l}$, wogegen die Zn-Werte im Mittel 10fach höher lagen. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß auch biologische Faktoren den Schwermetallgehalt im Oberflächenwasser beeinflussen. Der während der Auftriebsperioden höhere Schwermetallgehalt im Oberflächenwasser resultiert auch aus zersetztem Phytoplankton aus der Tiefe, das während einer Auftriebsphase an die Oberfläche gelangt und temporär zur Metallanreicherung des Seewassers führt. Andererseits nimmt nach der Auftriebsphase während erhöhter planktischer Produktivität die Metallkonzentration des Oberflächenwassers

wieder ab, wofür neben hydrographischen Faktoren auch die Absorption durch das Phytoplankton verantwortlich sein kann.

Auch zur Zeit intensiver Algenblüten sind Konzentrationsänderungen von Schwermetallen im Seewasser festzustellen (MORRIS 1971).

Der koloniebildende Flagellat *Phaeocystis*, der regelmäßig im späten Frühling in der Liverpool-Bay zu einer Massenentwicklung kommt, vermag während der Phase der kolonialen Aggregation in seiner interzellulären gallertigen Substanz nennenswerte Mengen von partikulärem und gelöstem Zink aufzunehmen. Darüberhinaus wird partikuläres Mangan an die Außenmembranen der Kolonien adsorbiert und es kommt zu Ende der Blüte, wenn die Außenmembranen der Kolonien zerfallen, zu einem plötzlichen Ansteigen der Mn-Konzentrationen im Oberflächenwasser.

BARBER u. RYTHER (1969) fanden, daß Auftriebswasser aus der Tiefe des Cromwell-Stromes - obwohl reich an anorganischen Nährstoffen - weniger das Wachstum von Phytoplankton förderte als vergleichsweise die umgebenden Wasserkörper. Das an die Oberfläche gelangende Tiefenwasser führt die hochtoxischen Cu^{2+} -Ionen mit sich, die die normale Phytoplanktonentwicklung beeinträchtigen. Die Cu-Ionen werden allerdings sehr schnell durch die im Oberflächenwasser reichlich vorhandene gelöste organische Substanz komplexiert, sodaß ihre Toxizität abgepuffert wird (SLOWEY et al. 1967).

Für die biologischen Effekte von Schwermetallen sind deren physikochemische Zustandsformen entscheidend. Der alkalische pH, der hohe Anionengehalt sowie die partikuläre und gelöste organische Substanz im Seewasser führen zu den verschiedensten Adsorptionsprozessen und Metall-Komplexbildungen. Anhand von mathematischen Modellen werden von ZIRINO u. YAMAMOTO (1972) die pH-abhängigen Zustandsformen von Cd, Cu, Pb und Zn im Seewasser untersucht.

SLOWEY, et al. (1967) konnten bis zu 50 % des im Seewasser enthaltenen Kupfers mit Chloroform extrahieren. Dieses Metall scheint assoziiert zu sein mit Phospholipiden, Carotenoiden und anderen lipidlöslichen Verbindungen. WILLIAMS (1969) stellte fest, daß der Gehalt an organisch gebundenem Cu im marinen Milieu erheblichen Schwankungen ausgesetzt ist (5 - 28 % des Gesamtgehalts).

Während einer "roten Tide" (hauptsächlich durch *Ceratium* spp. verursacht) konnte kaum organisch-assoziiertes Cu im Seewasser nachgewiesen werden, der Anteil an anorganisch gelöstem Cu stieg dagegen signifikant an.

MORRIS (1974) bestimmte den Gehalt des Seewassers der Menai-Straße (Nord-Wales) an ionischem und organisch-assoziiertem Cu, Mn, Ni und Zn über eine 2 Jahres Periode. Der Gehalt an ionischem Mangan, Nickel und Zink erreichte jeweils im Juni seinen Maximalwert (Mn: 16 ug/l, Ni: 2-3 ug/l, Zn: 50 ug/l). Zur gleichen Zeit wurden Flagellatenblüten (*Phaeocystis*) im Oberflächenwasser festgestellt. Der Anteil von organisch-komplexiertem Cu, Ni und Zn stieg im Frühling (während des Chlorophyll - a - Maximums) schnell an und blieb den ganzen Sommer über hoch, während er im Winter minimal war. Der organisch-gebundene Anteil am Gesamtmetallgehalt lag bei Zn im Bereich von 0 - 10 %, bei Ni im Bereich von 0 - 30 % und bei Cu im Bereich von 10 - 40 %. Hieraus kann abgeleitet werden, daß die Affinität dieser Schwermetalle zu gelöster organischer Substanz in der Reihe Zn - Ni - Cu zunimmt. Zink bildet in Seewasser mit schwach sauren Anionen auch anorganische Komplexe (ZIRINO u. HEALY 1970), wobei es sich im Bereich von pH 8 vorwiegend um gelöstes ZnCO_3^0 und Zn(OH)_2^0 handelt.

3. Adaption an Schwermetalle

Phytoplankter in Süß- und Salzwasser besitzen die Fähigkeit, sich bis zu einem gewissen Maße an normalerweise unverträglich hohe Metallkonzentrationen ihrer Umgebung zu adaptieren.

WHITTON (1970) untersuchte die speziesspezifische Toleranz von Süßwasser-Chlorophyten gegenüber den Schwermetallen Cu, Pb und Zn. Das Wachstumsverhalten von Algenproben, die aus Wasserblüten entnommen wurden und in standardisierten Kulturmedien gehältert wurden, diente als Indikation für die Verträglichkeit gegenüber dem betreffenden Metall. Die Schwermetallkonzentration, die gerade noch keine Wachstumsdepression hervorrief, wurde als Toleranzwert definiert.

Die Spezies *Cladophora glomerata* erwies sich gegenüber allen anderen Populationen, die etwa 26 Spezies repräsentierten, als der empfindlichste Organismus in Bezug auf Metallverunreinigung des Wassers. Diese Alge zeigte besonders gegenüber Blei einen sehr niedrigen Toleranzwert von 2 ppm, sodaß sie als guter Indikatororganismus für metallbelastetes Süßwasser dienen könnte. Ebenfalls sehr empfindlich gegenüber den 3 Schwermetallen war *Oedogonium* spp. Die Genera *Ulothrix* und *Microspora* zeigten dagegen hohe Resistenz

gegenüber allen 3 Metallen, einige *Microspora*-Populationen aus Blei-belasteten Flüssen vertrugen noch Konzentrationen von 48 ppm Pb. *Sporotetras pyriformis* und *Gongrospira spec.* waren erheblich Cu-toleranter als alle anderen Chlorophyten (0,5 bzw. 0,7 ppm).

Die untersuchten Algenspezies zeigten gegenüber Zink einen größeren Resistenzbereich (0,08 - 4,0 ppm) als gegenüber Kupfer (0,06 - 0,7 ppm). Generell lag bei allen Chlorophyten die Blei-Verträglichkeit bedeutend höher als die Toleranz gegenüber Cu und Zn.

In Labortanks mit dem hohen Zn-Gehalt von 8 mg/l konnte sich *Mougeotia spp.* soweit adaptieren, daß ein deutliches Wachstum dieser Alge noch bei 6 ppm Zink im Wasser stattfand.

Ähnlich hohe Adaptionsleistungen von Chlorophyten in metallverunreinigtem Flußwasser wurden von SUGIYAMA (1971) an Chlorellen beobachtet. Während einer extremen Blüte dieser Alge in belastetem Flußwasser (Algenkonzentration: $10^5 - 10^6$ /ml), dem 2 ppm Cu^{2+} bzw. 3 ppm Ni^{2+} , Zn^{2+} oder Cr^{6+} beigegeben wurde, trat keine Veränderung im Wachstum der Chlorella-Populationen auf. Nach einer Woche Aufenthalt in diesem Milieu wurden die Algen durch Zentrifugation geerntet und im selben Flußwasser einer Konzentration von 20 ppm Cu^{2+} bzw. 10 ppm Ni^{2+} , Zn^{2+} oder Cr^{6+} unterworfen. Trotz dieser Extremwerte konnte Chlorella weiter wachsen.

Die Toxizität der Metallionen schien in dem stark organisch belasteten Flußwasser (kein gelöster Sauerstoff war mehr nachweisbar) durch gelöste organische Substanzen weitgehend abgepuffert zu sein. Außerdem geben Algen gerade im Verlauf einer Blüte organische Substanzen an das Wasser ab.

Da im freien ozeanischen Wasser niemals so hohe Konzentrationsgradienten von Metallen auftreten wie im Süßwasser, sollte man annehmen, daß die Adaptionsfähigkeit mariner Algen kaum ausgeprägt ist. Doch im Küstenbereich, wo temporär hohe Konzentrationswerte von Schwermetallen - z.B. durch Abwasserdrift - auftreten können (siehe z.B. die Schwermetallwerte im Küstenwasser der Liverpool-Bay und des Bristol-Kanals: ABDULLAH et al. 1972) sowie in besonderen Habitaten, sind ebenfalls Adaptionserscheinungen vor allem der **Litoralflora** bekannt geworden.

Eine solche Anpassung an das Cu-haltige Milieu im Habitat wurde von der Braunalge *Ectocarpus siliculosus* berichtet (MORRIS u. RUSSELL 1970). Ein Vergleich von *Ectocarpus*-Populationen, die

von Küstenfelsen stammten mit solchen, die an regelmäßig mit Cu-haltigen Herbiziden behandelten Schiffsrümpfen wuchsen, zeigte deutliche Toleranzunterschiede hinsichtlich der Cu-Verträglichkeit. Die Populationen, die von Schiffsrümpfen stammten, zeigten eine 10fach höhere Toleranz gegenüber Kupfer als die Populationen, die auf unkontaminierten Felsen gewachsen waren. Bei *E. siliculosus* kann diese Adaption eher auf die bekannte große genetische Variabilität als auf eine physiologische Reaktionsbreite zurückgeführt werden.

4. Benthosalgen als Indikatoren für die Metallbelastung von Küstengewässern

Obwohl in dieser Arbeit die Metallkontamination von Planktonalgen behandelt wird, sollen im Vergleich dazu auch einige Untersuchungsergebnisse an benthischen Algen berichtet werden.

Als pflanzliche Indikatororganismen für den Schwermetallgehalt des marinen Küstenbereichs sind bisher vor allem Phaeophyceen und Rhodophyceen sowie *Ulva spec.* untersucht worden. Unter den Braunalgen ist die Gattung *Laminaria* als Untersuchungsobjekt besonders geeignet, weil diese Formen leicht in Kultur wachsen, sehr sensitiv auf Milieuänderungen reagieren und ohne Gewebezerstörung auch hohe Kontaminationen ertragen (BURROWS 1971). Außerdem bilden Laminarien einen bedeutenden Anteil des sublitoralen marinen Ökosystems entlang der europäischen Küsten.

HOPKINS u. KAIN (1971) untersuchten die Schwermetall-Verträglichkeit von *Laminaria hyperborea* mit folgenden Methoden: unter Metall-einfluß wurde während einer 28 tägigen Kulturzeit der Entwicklungsverlauf der Alge (Zoospore - Gametophyt - Sporophyt) beobachtet sowie das Wachstum und die Gewebeatmung (Meßzeit: 1 Tag) des Sporophyten verfolgt. Es ergab sich, daß das Wachstum des Sporophyten schon bei 0,01 ppm Hg, 0,05 ppm Cu und 0,25 ppm Zn beeinträchtigt wurde. Die Gametophyten-Generation erwies sich gegenüber Zink-Kontamination als widerstandsfähiger. Die toxischen Grenzwerte für die Gewebeatmung lagen über 1000fach höher als die wachstumslimitierenden Konzentrationen. Auch hier zeigte Quecksilber die höchste Toxizität: 2,5 ppm bewirkten bereits eine Reduzierung der Gewebeatmung, die sonst erst durch 100 ppm Cu und 1000 ppm Zn beeinflußt wurde.

Die Rotalge *Callithamnion hookeri* wurde von EDWARDS (1972) als Indikatororganismus für die Schadstoffbelastung der ostenglischen Küstengewässer herangezogen. *C. hookeri* eignet sich für solche Untersuchungen wegen seines schnellen Wachstums, sodaß schon nach 1 Woche der Zuwachs an neu gebildeten Zellen bestimmt werden kann. Außerdem entwickeln sich die Frühstadien dieser Rhodophyceen in Seewasser ohne zusätzliche Nährstoffanreicherung, wie sie sonst bei Algenkulturen üblich ist. Dies ist insofern von großer methodischer Bedeutung, weil für die Testung toxischer Metallionen keine komplexierenden Substanzen im Kulturmedium sein sollten (siehe unter 1.2.1.).

C. hookeri reagierte im Wachstum bereits auf 0,01 ppm Cu mit einer Verzögerung und erwies sich damit als besonders Cu-empfindlich (*Laminaria hyperborea*: 0,05 ppm Toleranzgrenze für Cu - siehe oben).

BONEY (1971) konnte an 2 Tage alten Sporophyten der Rotalge *Plumaria elegans* eine Dosis-Zeit-Abhängigkeit der Hg-Kontamination nachweisen. Sublethale Konzentrationen von Quecksilber akkumulierten sich in hinreichend langen Zeiträumen zu Lethaldosen. Bereits 0,12 ppm Hg verursachten während einer 3 - 6 stündigen Inkubationszeit (die etwa der Dauer einer Tiden-Überspülung der Litoralalge entspricht) eine etwa 30 % Wachstumshemmung. Die doppelte Hg-Dosis von 0,25 ppm führte schon nach 1 Stunde Kontaktzeit zu dem gleichen Ergebnis. Für n-Alkyl-Hg-Verbindungen wurden erheblich niedrigere toxische Konzentrationen gefunden. Die Toxizität dieser organischen Hg-Verbindungen erhöhte sich mit wachsender Länge der C-Kette (BONEY et al. 1959). Nach 2,5 min. Kontakt mit 0,5 ppm $n-C_3H_7HgCl$ trat bei den jungen *Plumaria*-Sporophyten eine 50 % Wachstumshemmung auf. 0,04 ppm $n-CH_3HgCl$ bewirkten die gleiche Hemmung nach 25 minütiger Inkubationszeit. Die hohe Toxizität besonders der organischen Hg-Verbindungen wird auf die Lipidlöslichkeit der aliphatischen C-Kette zurückgeführt, sodaß diese Verbindungen besser als anorganisches Quecksilber die lipidreichen äußeren Zellwandhüllen der Rotalgen passieren können (BONEY u. CORNER 1959).

Die Aufnahme und Akkumulation von Schwermetallen durch Rotalgen wird unter 2.3. näher behandelt.

Teil B: Kontamination in Laborkultur-Experimenten

1. Faktoren, die die Toxizität von Schwermetallen in Laborkulturen beeinflussen

Schwermetall-Toxizitätstests in Laborkulturen sind von einer Reihe experimenteller Parameter abhängig, die entscheidend die Ergebnisse beeinflussen. Zu diesen Parametern gehören u.a. die Zelldichte des Kultur-Inoculums, die Zusammensetzung des Kulturmediums, die physikalischen Hälterungsbedingungen wie Licht, Temperatur, Belüftung, Turbulenz und die Beschaffenheit der Kulturgefäß-Oberfläche. Da bei physiologischen Messungen z.T. sehr geringe Metallkonzentrationen eingesetzt werden (μg -Bereich), muß auf den letzten Punkt besonders geachtet werden, denn normale Glasgeräte adsorbieren einen bestimmten Teil der gelösten Metallionen. Von manchen Experimentatoren wird deshalb das Glas der Kulturgefäße vorher mehrfach mit starken Mineralsäuren behandelt. Eine Sterilisation der Nährlösungen ist auch in einigen Fällen indiziert, wo mikrobielle Aktivität die chemische Zustandsform eines untersuchten Metalls in der Lösung verändern kann (z.B. im Falle des Quecksilbers).

Hier soll nur der Einfluß weniger dieser Faktoren kurz angedeutet werden.

1.1. Licht

Licht als Motor photosynthetischer Produktion sollte alle Effekte von Schwermetallen auf die Photosynthese und davon direkt abhängiger Stoffwechselprozesse beeinflussen. Wie später ausgeführt wird, erfolgt bei vielen Algen die Aufnahme von Schwermetallen mithilfe metabolischer Energie, die aus Photosyntheseprodukten bezogen wird. So erfolgt die Aufnahme und Abgabe von ^{65}Zn bei den marinen Benthosalgen *Ulva lactuca* und *Porphyra umbilicalis* im Dauerlicht schneller als in der Dunkelheit (GUTKNECHT 1963). WHITTON (1968) untersuchte den Einfluß des Lichts bei Toxizitätstests an Kulturen von *Anacystis nidulans*. Es zeigte sich, daß bei Applikation von Cu, Mn und Hg im Licht (Kurzzeitexperiment: 6 Stunden bei 6000 Lux) deren Toxizität deutlich geringer war als in der Dunkelheit. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt beim Cu-Ion, dessen noch zulässige subtoxische Konzentration in der

Dunkelheit 10fach niedriger lag als im Licht.

Auch die Hemmung der Zellteilung bei Chlorella unter Cu-Einfluß ist bei kontinuierlicher Beleuchtung weniger ausgeprägt als in der Dunkelheit (KANAZAWA u. KANAZAWA 1969).

Die Diatomee *Skeletonema costatum* reagierte in einem Licht-Dunkel-Zyklus (15 : 9, 4000 Lux) 5fach empfindlicher auf Cu-Ionen als bei kontinuierlicher Beleuchtung (MANDELLI 1969).

Hervorgehoben werden muß auch, daß Sonnenlicht die oligodynamische Wirkung von Kupfermetall in Wasser verstärkt. Dieser Effekt wird in Israel in der Teichwirtschaft berücksichtigt, wo man das Speisungswasser für die Teiche durch Kupfernetze leitet, die direkt dem Sonnenlicht ausgesetzt sind (BANK 1962).

1.2. Zusammensetzung des Kulturmediums

1.2.1. Chelatbildner als Toxizitätspuffer

Chelatbildner wie z.B. EDTA komplexieren zweiwertige Metallionen und verringern dadurch deren ionische Zustandsform in einer Kulturlösung. Gerade freie Metallionen haben sich aber als hochtoxisch gegenüber einzelligen Algen erwiesen. Chelatbildner verringern die Toxizität von Schwermetallen, was sich im Falle des Kupfers besonders gut demonstrieren ließ.

MORRIS u. RUSSELL (1973) inkubierten *Ectocarpus siliculosus* in 2 gleichen Nährlösungen, wovon die eine chelatfrei war und die andere 3,7 mg EDTA/l enthielt. Bei 0,45 mg Cu^{2+} /l fand ein totaler Wachstumsstopp im EDTA-freien Medium statt, während die kritische Konzentration für die Wachstumshemmung von *Ectocarpus* in Gegenwart von EDTA über 0,85 mg Cu^{2+} /l lag. Es konnte berechnet werden, daß die Größe der Toxizitätsabnahme des gelösten Kupfers abhängig war von der Komplexbildung zwischen einem Cu^{2+} -Ion und 1 - 1,5 Molekülen EDTA.

Gibt man CuEDTA in einer Konzentration, die der Lethaldosis von CuSO_4 bei Chlorella entspricht, so läßt sich nur mäßige Wachstumsdepression bei dieser Alge feststellen (SOEDER et al. 1967).

WHITTON (1967) zeigte, daß die Toxizität von Cu, Hg, Mn, Ni, Pb und Zn gegenüber *Cladophora glomerata* bei Anwesenheit von EDTA im Medium geringer war. Je geringer die toxische Metallkonzentration war (vor allem bei Cu und Zn), umso deutlicher wirkte sich dieser Schutzeffekt des Komplexbildners aus.

Oft ist Eisen in Nährlösungen das limitierende Spurenelement. Deshalb wird es in relativ hoher Dosierung als EDTA-Komplex (0,05 mM FeEDTA/l) verwendet (SOEDER et al. 1967). Der CuEDTA-Komplex ist aber mit einer Stabilitätskonstanten $pK_s = 18,8$ stabiler als der Fe(II)EDTA-Komplex mit $pK_s = 14,3$, sodaß bei Toxizitätstests mit Cu-Verbindungen die Anwesenheit von EDTA sowie anderer Komplexe vermieden werden sollte (siehe auch FITZGERALD u. FAUST 1963). Eine Übersicht über die Wirkung verschiedener organischer Cu-Komplexe auf die Photosynthese bei *Scenedesmus quadricauda* gibt FÄNGSTRÖM (1972).

STEEMANN NIELSEN u. WIUM-ANDERSEN (1970) untersuchten den Einfluß von freien Cu^{2+} -Ionen in einem Medium, das weder EDTA noch Citrat enthielt. Weiterhin wurde die Fe-Konzentration so niedrig gehalten (6 ug Fe/l), daß es nicht - wie sonst bei alkalischem pH 8 in Kulturmedien - zur kolloidalen Ausfällung feinst verteilten hydratisierten $Fe(OH)_3$ kam. Das Eisenhydroxid-Hydrat besitzt negative Ladungen, an denen Cu^{2+} -Ionen elektrostatisch gebunden werden können. Unter diesen Bedingungen, wo der Hauptteil des Kupfers als gelöstes Cu^{2+} - Ion vorliegt, sind selbst 1 ug Cu/l toxisch gegenüber einzelligen Algen. Da die Kupferkonzentrationen im Süßwasser und im marinen Bereich einige ug/l betragen, muß angenommen werden, daß unter natürlichen Verhältnissen fast gar kein rein ionisch gelöstes Kupfer im Wasser anwesend ist. (SLOWEY et al. 1967).

STEEMANN NIELSEN u. WIUM-ANDERSEN (1970) geben zu bedenken, daß aufgrund der erkannten hohen Toxizität des freien Cu^{2+} - Ions kein normal destilliertes Wasser für die Verdünnung von ^{14}C -Ampullen für Produktivitätsmessungen verwendet werden sollte. Im normal destillierten Wasser des Handels liegt die aktuelle Cu-Konzentration im Durchschnitt in einem Bereich (für Dänemark: 260 ug Cu/l, SCHOU 1954), der bereits toxische Effekte auf einzellige Algen in Laborkulturen bewirken kann. Bei Produktivitätsmessungen sollte deshalb nur über Glas destilliertes Wasser verwendet werden, das nur Spuren von Cu enthält.

1.2.2. Bodensedimente als Quelle mikrobieller Aktivität

Bei Toxizitätstests von Hg^{2+} -Ionen auf aquatische Organismen in Gegenwart von natürlichem Bodensediment muß darauf geachtet werden, daß biologische Methylierung des Quecksilbers auftreten kann. JENSEN u. JERNELÖV (1969) studierten die biologische Methylierung von HgCl_2 zu CH_3HgCl und CH_3HgCH_3 in Bodensedimenten und in faulendem Fisch in einem Süßwasser-Aquarium. Von 100 μg HgCl_2/g Bodensediment wurden nach 10 tägiger Inkubation bei 24° Celsius 440 ng zu CH_3HgCl umgewandelt. Sterilisiertes Bodensediment zeigte dagegen keinen höheren CH_3HgCl -Gehalt als der Kontrollwert. Dieser Befund deutet auf eine mikrobielle Methylierung anorganischen Quecksilbers im Sediment hin. In toten Fischen (*Xiphophorus maculatus*) wurde nach 3 Wochen Inkubation (24° Celsius) unter anaeroben Bedingungen in einem geschlossenen Gefäß fast 50 % einer applizierten Menge von Methylquecksilber in Dimethylquecksilber konvertiert. Diese mikrobielle Methylierung von Quecksilber scheint auch unter natürlichen Verhältnissen - vor allem in stark eutrophierten Seen - eine regulierende Rolle bei der Selbstreinigung eines Ökosystems zu spielen. Denn durch Konversion von anorganischem Quecksilber zu flüchtigen organischen Verbindungen kann das giftige Metall aus dem System entfernt werden (JERNELÖV 1970).

Falls Bodenproben in einem Kultursystem eingesetzt werden, sollten sie aus den oben genannten Gründen vorher autoklaviert werden.

1.2.3. pH und Salinität

Der pH einer Lösung beeinflusst die Verteilung verschiedener, nebeneinander in einer Lösung existierender chemischer Zustandsformen eines bestimmten Metalls. Außerdem beeinflusst die H^+ -Ionenkonzentration einer Lösung die Verteilung von positiven und negativen Festladungen an Grenzflächen, zu denen auch biologische Membranoberflächen gehören. Die Adsorption von Metallionen an Biomembranen und deren mögliche anschließende Passage ins Cytoplasma sind deshalb wesentlich von den pH-Bedingungen des Milieus abhängig. Weiterhin sind auch aktive Ionentransport-Prozesse in einer biologischen Membran vom pH-Gradienten über der Membran abhängig (siehe z.B. die 'Chemiosmotische Hypothese' von MITCHELL 1965).

MANCY (1972) stellte fest, daß bei ansteigendem pH im Wasser auch die Toxizität von Kupfer gegenüber Fischen zunahm. MOUNT (1966) beschrieb eine Zunahme der Zn-Toxizität gegenüber Wasserorganismen bei einem Anstieg des pH von 6 bis 8.

Bei hohen H^+ -Ionenkonzentrationen in einer Lösung treten zwischen Metallion und Proton Konkurrenzeffekte um Bindungsstellen an Zellmembranen von einzelligen Algen auf (STEEMANN NIELSEN u. KAMP-NIELSEN 1970). Aus diesem Grunde ist vielleicht der Einfluß toxischer Cu-Konzentrationen auf Photosynthese und Wachstum von Chlorella-Kulturen bei pH 5 wesentlich geringer als bei pH 8. Es wurde bei pH 5 ein geringerer Teil des angebotenen Kupfers von Chlorella pyrenoidosa aufgenommen als bei pH 8 (STEEMANN NIELSEN et al. 1969). Analog zu diesen Ergebnissen wurde auch bei der Applikation von Hg-Ionen in ein Algenkultur-Medium festgestellt, daß im sauren pH-Bereich die Hemmung der Photosyntheserate von C. pyrenoidosa durch das Schwermetall weniger gravierend war als bei dem für Kulturmedien üblichen pH 8 (KAMP-NIELSEN 1971). Auch die Hemmung der Zellteilung durch Cu-Ionen ist pH-abhängig. Bei pH 6 wurde gegenüber anderen pH-Werten der stärkste Hemmeffekt von Cu-Ionen auf die Zellteilung von synchronisierten Chlorellen festgestellt (KANAZAWA u. KANAZAWA 1969).

Die Cu-Aufnahme mariner Phytoplanktonalgen nimmt mit steigender Salinität ab. Zwischen dem log der Cu-Aufnahme/Algenbiomasse und der Salinität besteht eine negative Korrelation (MANDELLI 1969).

2. Toxizität einzelner Schwermetalle und deren physiologische Ursachen

2.1. Kupfer

2.1.1. Einfluß auf das Wachstum (Zellteilung)

Die Anwendung von Kupfersalzen in der Teichwirtschaft zur Vernichtung unerwünschten Algenwachstums ist seit Beginn dieses Jahrhunderts bekannt. In Forellenteichen wird die Applikation von 1 g $CuSO_4/m^3$ Wasser als wirksame Konzentration zur Ausschaltung von Fadenalgen empfohlen (JAHN 1969). Konzentrationen von 0,25 ppm $CuSO_4$ sollen geeignet sein, in Süßwasserseen den Hauptteil des planktischen Algenwachstums zu kontrollieren, ohne dabei Fische zu schädigen noch die Trinkwassergüte zu beeinträchtigen (PARTSCH 1954).

Die hohe Giftigkeit des Kupfers ist auch im marinen Bereich zu einer Gefahr für das Phytoplankton geworden, seitdem Cu-haltige Abwässer vor allem durch die Flüsse ins Meer geschwemmt werden. So berichtet MARVIN et al. (1961), daß Cu-Konzentrationen, die etwa 10fach höher liegen als die Normalwerte im Seewasser (3 - 5 ug Cu/l) lethal sind für den Dinoflagellaten *Gymnodinium breve*, der oft die Ursache 'roter Tiden' ist.

a) marine Algen

Der inhibitorische Effekt von Cu-Ionen auf das Wachstum von 9 Spezies mariner Phytoplankter wurde eingehend von MANDELLI (1969) untersucht. Es wurden Cu-Konzentrationen von 30 - 50 ug/l (30 - 50 ppb) in Batch-Kulturen unter kontinuierlicher Beleuchtung (4000 Lux) eingesetzt. Am empfindlichsten auf Kupfer reagierte die Cyanophyce *Coccochloris elabans*, für die das Schwermetall bereits in einer Konzentration von 30 ug/l toxisch war. Die Chlorophyce *Dunaliella tertiolecta* zeigte dagegen hohe Resistenz, diese Alge konnte noch bei Cu-Konzentrationen im Medium wachsen, die nahe am Sättigungswert für Seewasser lagen (ca. 600 ug Cu/l). Allgemein lag der toxische Konzentrationsbereich des Kupfers für Dinoflagellaten (*Exuviella spec.*: 45 - 25 ug/l, *Glenodinium spec.*: 55 - 30 ug/l) erheblich niedriger als für Diatomeen (*Skeletonema costatum* vertrug noch 250 ug/l).

Das Metall wurde von allen untersuchten Algengruppen sehr schnell aus der Lösung aufgenommen, worauf eine langsame Abgabe erfolgte, die auf eine Permeabilitätssteigerung der Zellwand und/oder auf aktive Exkretion zurückgeführt werden könnte. Die Menge des in die Zellen aufgenommenen Kupfers war direkt proportional zur externen Konzentration im Medium (30° Celsius). Die Konzentrationsfaktoren der verschiedenen Spezies waren umgekehrt proportional zur jeweils toxischen Cu-Konzentration, sie lagen also bei den Dinoflagellaten höher als bei den Diatomeen.

Die Kupferaufnahme verlief proportional zur Temperatur im Bereich von 20 - 35° Celsius mit einem Q_{10} -Wert von 1,95.

Zur Schnelltestung von Phytoplanktonalgen auf Cu-Empfindlichkeit wurden von ERICKSON et al. (1970) eine Selektionierungstechnik entwickelt, die verschiedene die Toxizität beeinflussende Umweltfaktoren berücksichtigt. Dabei wurden 12 Phytoplanktonarten aus dem Ästuarbereich in synthetischem, vorher sterilisierten und

auf 23,4 ‰ Salinität eingestellten Seewasser gehältert. Kupfer wurde im Bereich von 50 - 3000 µg/l eingesetzt. Aus diesem Medium wurden 6 Spezies selektioniert auf der Basis von Cu-Sensitivität, Wachstumsgeschwindigkeit und ökologischer Relevanz. Diese 6 Spezies wurden unter folgenden experimentellen Bedingungen weiter getestet. In filter-sterilisiertem künstlichen sowie natürlichem angereicherten Seewasser wuchsen die Algen bei einer Anfangskonzentration von $1,5 - 9 \cdot 10^6$ Zellen/l 14 Tage lang bei Cu-Konzentrationen, die in 50 µg-Schritten von 50 - 450 µg/l erhöht wurden. Das Wachstum wurde außerhalb der exponentiellen Phase durch die Messung der optischen Dichte bei 420 nm verfolgt. Alle verwendeten Lösungen wurden vorher sterilisiert und danach mit Nähragar auf bakterielle Kontamination überprüft. Die Glasgeräte wurden wegen der Metallkontaminationsgefahr mehrfach mit starken Säuren und glasdestilliertem Wasser gewaschen.

Die empfindlichsten Algen unter diesen Bedingungen waren *Amphidinium carteri*, *Olisthodiscus luteus* und *Cyclotella nana*, sie wurden durch 50 µg Cu/l zu mehr als 80 % in ihrem Wachstum gehemmt. Bei 100 µg Cu/l wurde das Wachstum von *Skeletonema costatum* zu 64 % reprimiert. *Isochrysis galbana* wurde bei der gleichen Konzentration zwar wesentlich stärker gehemmt, vertrug aber noch 150 µg Cu/l mit etwa der gleichen prozentualen Wachstumseinbuße. Mit Abstand als die resistenste Form erwies sich *Dunaliella tertiolecta*, die bei 450 µg Cu/l etwa zu 50 % im Wachstum eingeschränkt war. Diese Werte des Cu-Einflusses auf das Wachstum wurden nach Inkubation in angereichertem natürlichem Seewasser erhalten. Ein Vergleich dieser Werte mit solchen, die in künstlichem Seewasser erhalten wurden, ergab keine signifikanten Unterschiede.

ERICKSON (1972) untersuchte die Toxizität von Kupfer an *Thalassiosira pseudonana* (*Cyclotella nana*, Klon 13-1) in natürlichem, durch Nährsalze nicht zusätzlich angereicherten Seewasser. Das Seewasser wurde vor der Inkubation mit den Algen durch Millipore GS 0,22 µ gefiltert, um natürliches Nanoplankton und suspendiertes organisches Material aus dem Wasser zu entfernen. Weiterhin wurde das Seewasser 30 min. bei 60° Celsius pasteurisiert (höhere Temperaturen wurden wegen der Gefahr der Ausfällung von Nährstoffen im Wasser vermieden). Populationsdichte, mittleres Zellvolumen

und ^{14}C -Aufnahme (Assimilationsaktivität) wurden nach 24, 48 und 72 Stunden gemessen bei einem Licht-Dunkel-Zyklus von 14 : 10 (2691 Lux). Kupfer wurde im Bereich von 5 - 30 $\mu\text{g/l}$ eingesetzt. Die Cu-Hemmung des Wachstums von *T. pseudonana* erhöhte sich proportional zur Länge der Expositionszeiten bei allen eingesetzten Metallkonzentrationen. 5 $\mu\text{g Cu/l}$ erzielten nach 72 Stunden den gleichen Hemmeffekt wie 10 $\mu\text{g Cu/l}$ nach 48 Stunden Exposition (etwa 40 % Wachstumshemmung). Ebenso nahm die Photosynthesehemmung mit der Länge der Expositionszeit zu. Während 5 $\mu\text{g Cu/l}$ nach 24 Stunden die Assimilation noch nicht beeinflussten, trat nach 48 Stunden eine 30 %ige und nach 72 Stunden eine etwa 50 %ige Hemmung der ^{14}C -Bikarbonataufnahme ein. Im Bereich von 10 - 30 $\mu\text{g Cu/l}$ nahm das mittlere Zellvolumen von *Thalassiosira* zu. Nach 72 stündiger Inkubation der Kulturen in 30 $\mu\text{g Cu/l}$ hatte das mittlere Zellvolumen um 165 % gegenüber dem Kontrollwert zugenommen. Gealterte Seewasser-Proben mit zersetztem Planktondetritus ergaben nach Sterilisation schwächere Cu-Toxizität als Seewasser, das sofort nach Entnahme sterilisiert worden war. Die Anwesenheit von Bakterien hatte jedoch keinen nennenswerten Effekt auf die Cu-Toxizität. Dies deutet daraufhin, daß vornehmlich bakterielle Zersetzungsprodukte, adsorptionsfähiges partikuläres Material sowie gelöste organische Substanzen - die in gealtertem Seewasser vermehrt vorhanden sind - die Schwermetall-Toxizität herabsetzen. Bei einer so Cu-empfindlichen Alge wie *Thalassiosira* mußte auf mögliche Cu-Kontamination der verwendeten Glasgeräte geachtet werden. Es zeigte sich nämlich, daß der Cu-Gehalt von Seewasser, das in Borsilikatgläsern aufbewahrt wurde, im Verlauf von 28 Tagen um 0,83 $\mu\text{g/l}$ anstieg. Das natürliche Seewasser wurde deshalb gefroren in Polyäthylenmaterial aufbewahrt. Dabei änderte sich der natürliche Cu-Gehalt von ca. 1 $\mu\text{g/l}$ nicht wesentlich. Da bei 5 ppb Cu bereits eine Wachstumshemmung bei einer marinen Planktonalge festgestellt werden konnte, sollte bei Kulturversuchen mit künstlich hergestelltem Seewasser (Durchschnittsgehalt an Cu: 6,7 $\mu\text{g/l}$, nach ERICKSON et al. 1970) eine Vorbehandlung zur Extraktion der Cu-Ionen erfolgen.

Die Entfernung von Spurenmetallen wie Cd, Cu, Fe, Mn, Pb und Zn aus natürlichem und künstlichem Seewasser gelingt mit dem Chelatharz

Chelex 100 (Bio-Rad), das die Schwermetalle am effektivsten bindet, wenn es gereinigt in der Natrium-Form vorliegt (DAVEY et al. 1970).

b) Süßwasseralgen

Die hochtoxische Wirkung freier Cu^{2+} -Ionen auf das Wachstum einzelliger Algen wurde in Kulturmedien entdeckt, die keine Chelatbildner wie EDTA und Citrat sowie nur geringste Mengen von Eisen (z.B. 6 $\mu\text{g Fe/l}$) - wegen der Gefahr der Cu-Ionenadsorption an negative Ladungen von Eisenhydroxid-Micellen im alkalischen Milieu - enthielten (STEEMANN NIELSEN u. WIUM-ANDERSEN 1970, STEEMANN NIELSEN u. KAMP-NIELSEN 1970, STEEMANN NIELSEN u. WIUM-ANDERSEN 1971). Wie STEEMANN NIELSEN u. KAMP-NIELSEN (1970) nachwiesen, beeinträchtigt bereits 1 $\mu\text{g Cu/l}$ (1 ppb) das Wachstum von Kulturen der Chlorophyceae *Chlorella pyrenoidosa* (= *C. fusca*, St.211-8b). Die Alge reagierte auf diese Cu-Konzentration mit einer 24 stündigen lag-Phase im Wachstum, nach der wieder normales logarithmisches Wachstum auftrat. 5 $\mu\text{g Cu/l}$ erzeugten eine 48 stündige lag-Phase, danach kam es ebenfalls wieder zu normalen Zellteilungsraten. 100 $\mu\text{g Cu/l}$ verhinderten dagegen das Wachstum der Kulturen vollständig. Es wurde bei diesen Untersuchungen mit 6 $\mu\text{g Fe/l}$ Medium sowie einer geringen Inoculum-Konzentration von etwa 10^7 Zellen/l gearbeitet.

Im Vergleich zu *Chlorella* erwies sich unter fast identischen Bedingungen die Diatomee *Nitzschia palea* als weniger Cu-empfindlich (STEEMANN NIELSEN u. WIUM-ANDERSEN 1971). 12,5 $\mu\text{g Cu/l}$ verursachten bei dieser Alge eine 4 tägige lag-Phase in der Kultur, danach wurde wie im Falle von *Chlorella* normales Wachstum beobachtet. Dieses Ergebnis wurde bei einer initialen (Inoculum-) Zellkonzentration von 10^7 /l erhalten. Bei einer initialen Zellkonzentration von $2 \cdot 10^5$ /l genügten schon 7,5 $\mu\text{g Cu/l}$, um das Wachstum der *Nitzschia*-Kultur vollständig zu verhindern.

Bei Versuchen mit synchronisierten *Chlorella*-Kulturen in einem Licht-Dunkel-Zyklus von 16 : 8 Stunden (nach der Technik von SOEDER et al. 1967) wurde nachgewiesen, daß der Cu-Einfluß auf das Wachstum sehr entscheidend vom jeweiligen Teilungsstadium einer Algenkultur abhängig ist. Wurde Cu zu einem Zeitpunkt gegeben, in dem die Initialschritte einer Zellteilung weitgehend abgeschlossen waren, so wurde die Zellteilung auch zu Ende geführt. Erst der

nächste Teilungsvorgang wurde dann unter Cu-Einfluß verzögert oder gänzlich verhindert. Weiterhin verursachte Kupfer, daß ein hoher Prozentsatz von Zellen anstatt 4 nur 2 Autosporen ins Medium entließen. Wurden Chlorella-Kulturen Cu-Konzentrationen unterworfen, die keinerlei Zellteilung mehr zuließen, so kam es dennoch nicht zum Absterben der Algenzellen. Nach Überführung in Cu-freies Medium wurde sukzessive die ursprüngliche volle Teilungsaktivität wiedererlangt (STEEMANN NIELSEN u. KAMP-NIELSEN 1970).

2.1.2. Bindung an die Zellwand und Verteilung

Cu-Ionen hemmen die Zellteilung (das Wachstum) einzelliger Algen, indem sie an den äußeren Schleimhüllen und den Zellwänden angreifen (STEEMANN NIELSEN et al. 1969). Diese Erklärung der Cu-Toxizität wird durch eine Reihe von Befunden gestützt.

Die Hemmung des Algenwachstums bei Anwesenheit einer bestimmten Menge von Cu-Ionen wird nach einer gewissen Zeit, wenn genügend hohe Zelldichten im Medium erreicht worden sind, fast vollständig aufgehoben. Eine generelle Schädigung des intrazellulären Stoffwechsels (mit der bei hohen Cu-Konzentrationen allerdings gerechnet werden muß) würde sich dagegen in einem dauernden Dekrement des Wachstums auswirken.

Die im Vergleich zu Chlorella geringere Cu-Empfindlichkeit wachsender Nitzschia-Kulturen kann durch den Befund erklärt werden, daß die Diatomee im Gegensatz zu Chlorella während des Cu-Kontaktes organische Verbindungen an die Umgebung abgibt, die einen Teil der hochtoxischen Schwermetallionen binden. Offensichtlich wird die Zellwand von Diatomeen durch Cu erheblich geschädigt, sodaß größere organische Moleküle diese Barriere passieren können (STEEMANN NIELSEN u. WIUM-ANDERSEN 1971).

Weitere Indizien dafür, daß die Zellwand (Zellmembran) der hauptsächliche Angriffsort von Cu-Ionen ist, wurden von KANAZAWA u. KANAZAWA (1969) geliefert. Sie untersuchten in Synchronkulturen von *C. ellipsoidea* die Hemmung der Zellteilung durch Cu unter verschiedenen Kulturbedingungen. Bei Cu-Konzentrationen von $3 \cdot 10^{-6}$ M (ca. 192 µg Cu/l) wurde die Zellteilung sowohl im Licht als auch in der Dunkelheit fast vollständig eingestellt, wogegen DNA-Synthese und Kernteilung normal abliefen. In deionisiertem Wasser

war die Teilungshemmung weniger ausgeprägt als bei Gegenwart üblicher Ionenstärken in der Nährlösung. Dies deutet daraufhin, daß Cu-Ionen den bei einer Zellteilung stattfindenden Efflux von Ionen durch die Zellmembran behindern, denn bei geringen Ionenstärken im Medium wird ein solcher Efflux erleichtert.

Messungen der Cu-Aufnahme von Chlorellen nach einstündiger Expositionszeit (50 µg Cu/l) ergaben, daß bei pH 8 fast 10fach mehr Cu von den Zellen absorbiert wird als bei pH 5. Eine Erhöhung der Konzentration von K^+ -Ionen im Medium dämpfte die toxische Wirkung von Kupfer. Diese Ergebnisse können so interpretiert werden, daß sowohl H^+ -Ionen als auch K^+ -Ionen mit den Cu^{2+} -Ionen um Bindungsstellen an der Zellwand konkurrieren (STEEMANN NIELSEN et al. 1969). Mikroskopisch wurde festgestellt, daß die pektinöse äußere Schleimsubstanz einzelliger Algen in Gegenwart von Cu-Ionen etwas anschwillt (STEEMANN NIELSEN u. KAMP-NIELSEN 1970).

Es gelang bei der Characee *Nitella spec.* die Verteilung von Kupfer in den Zellen zu verfolgen (RATHSACK u. SACHERT 1969). Nach einstündiger Behandlung von Internodialzellen mit sublethalen Cu-Konzentrationen (10^{-7} - 10^{-6} M ^{64}Cu) und nachfolgender Fraktionierung in Zellwand, Protoplasma und Vakuolenflüssigkeit wurde ^{64}Cu zu etwa 90 % in der Zellwand angereichert nachgewiesen. Im Protoplasma wurden etwa 10 % Cu-Gehalt gemessen, wogegen die Vakuole praktisch kein Kupfer aufgenommen hatte. Diese Verteilung änderte sich nicht wesentlich im sauren und alkalischen Bereich. Auch höhere lethale Cu-Konzentrationen (10^{-4} M) lieferten ein ähnliches Verteilungsmuster, allerdings nahm unter diesen Bedingungen die Vakuolenflüssigkeit etwa gleichviel Kupfer wie das Protoplasma auf. Die zeitabhängige Cu-Aufnahme verlief exponentiell, innerhalb der ersten 10 Minuten Expositionszeit war bereits mehr als die Hälfte des Endgehalts zellgebundenen Kupfers von den Zellen absorbiert worden.

2.1.3. Einfluß auf die Photosynthese

Die Hemmung der Photosynthese von *C. pyrenoidosa* durch Cu-Ionen setzt bei Dauerbelichtung erst nach einigen Stunden ein und ist bei hohen Lichtintensitäten am meisten ausgeprägt. Bereits 2,5 µg Cu/l beeinträchtigt die Assimilationsrate (STEEMANN NIELSEN et al. 1969)

Bei niedrigen Cu-Konzentrationen (1 - 50 $\mu\text{g/l}$) findet kaum Penetration des Schwermetalls ins Cytoplasma statt und die Hemmung der Photosynthese beruht offensichtlich auf einem indirekten Effekt. Hierbei wird das Metall an die äußeren Zellwandsubstanzen wie auch ans Plasmalemma gebunden, was neben der Hemmung der Autosporen-freisetzung auch zu einer Akkumulation von Photosynthese-Produkten führt. Bei andauernder Photosynthese und Verhinderung vollständiger Zellteilungen durch membrangebundenes Kupfer häufen sich die Assimilate in einer Zelle so sehr an, daß es zu einem negativen Feed-back auf den Assimilationsprozess kommt. Aus diesem Grunde wird die Photosynthese in Gegenwart von Kupfer erst nach einigen Stunden gehemmt, wenn eine kritische Konzentration von Assimilaten in der Zelle erreicht worden ist. Auch die stärkere Hemmung der Photosynthese bei hoher Lichtintensität wird durch diesen indirekten Einfluß der Cu-Ionen erklärbar. (STEEMANN NIELSEN et al. 1969).

Der Einfluß von Cu-Ionen auf die Photosyntheserate der Diatomee *Nitzschia palea* wurde von STEEMANN NIELSEN u. WIUM-ANDERSEN (1971) unter fast den gleichen experimentellen Bedingungen untersucht, wie sie bei der Untersuchung dieses Problems in *Chlorella*-Kulturen eingehalten wurden (s.o.).

Während *Chlorellen* erst nach längerer Expositionszeit (20 Stunden) und hohen Lichtintensitäten (21 kLux) deutlich durch Kupfer in ihrer Photosyntheserate gehemmt wurden, zeigte *Nitzschia* eine solche Hemmung bereits nach kurzer Expositionszeit (4 Stunden) sowie auch bei geringeren Lichtintensitäten. Eine 30 %ige Abnahme der Photosyntheserate wurde in *Nitzschia*-Kulturen nach 4 Stunden durch 1,2 $\mu\text{g Cu/l}$ erzielt, während in *Chlorella*-Kulturen die gleiche prozentuale Hemmung erst nach 20 Stunden durch 5 $\mu\text{g Cu/l}$ erreicht wurde.

In einem Licht-Dunkel-Zyklus von 12 : 12 Stunden (6000 Lux) wurde eine weitgehend synchronisierte *Nitzschia*-Kultur erhalten. Applikation geringer Mengen Cu (6 $\mu\text{g/l}$) zu verschiedenen Zeiten des Wachstumszyklus ergab, daß der toxische Effekt des Schwermetalls in der Dunkelperiode, die unmittelbar auf eine Zellteilung folgte, am deutlichsten ausgeprägt war. Unmittelbar nach Beginn der Lichtperiode war dagegen der Cu-Einfluß auf die Photosyntheserate der Kultur am geringsten.

Die sofortige Hemmung der Photosynthese von *Nitzschia palea* selbst nach kurzzeitigem Kontakt mit Cu-Ionen beruht offensichtlich auf einem anderen Mechanismus als er für die Photosynthesehemmung von *Chlorella*-Kulturen angenommen wird (s.o.). Es ist vielmehr wahrscheinlich, daß selbst geringste Cu-Konzentrationen die Zellwand von Diatomeen erheblich schädigen - was sich auch durch die Exkretion organischer Verbindungen zu erkennen gibt - und ins Zellinnere penetrieren (STEEMANN NIELSEN u. WIUM-ANDERSEN 1971).

2.1.4. Einfluß auf die Atmung

Wie andere Mikroorganismen vermag *Chlorella* in Gegenwart eines typischen Atmungsgiftes wie dem F^- -Ion, das spezifisch die Enolase und damit den Eingang zum Citratzyklus blockiert, trotzdem weiter zu atmen, indem der Energiestoffwechsel auf die direkte Oxidation der Glucose (Pentose-Phosphat-Weg) umgeschaltet wird. Sind aber F^- und Cu^{2+} Ionen gleichzeitig anwesend, so wird die Atmung fast vollständig eingestellt (HASSALL 1967 u. 1969). Wird erst Cu und dann Fluorid angeboten, so kommt es ebenfalls zu einer Blockade der Zellatmung. Werden aber Fluorid-Ionen über längere Zeit (z.B. 90 Minuten) mit *Chlorellen* zusammen inkubiert, bevor Cu-Ionen der Nährlösung beigegeben werden, so ist nur eine leichte Atmungsdepression festzustellen. Cu-Ionen scheinen daher vermutlich den Pentosephosphat-Weg von *Chlorella* teilweise zu blockieren. Die Hemmung dieses metabolischen "Auswegs" von *Chlorella* bei Blockade des Citratzyklus scheint aber nicht spezifisch zu sein, denn nach ausreichend langer Präinkubation mit Fluorid vermag diese Alge in Gegenwart von Cu-Ionen beinahe normal zu atmen.

2.2. Quecksilber

2.2.1. Weltweite Verbreitung und Gefahr für aquatische Ökosysteme

In einem Übersichtsartikel nimmt HARRISS (1971) zur ökologischen Bedeutung des Quecksilbers in aquatischen Lebensräumen Stellung. Allein in den USA sind in den letzten 25 Jahren ungefähr 30 Mio. Kilogramm Quecksilber an die Umwelt als Abfall abgegeben worden. Die hohe Giftigkeit dieses Metalls auch gegenüber Menschen wurde der Weltöffentlichkeit erstmals deutlich, als nach dem Genuß Hg-haltigen Fisches Hunderte von Japanern schwer und oft tödlich er-

kranken ('Minamata-Krankheit', siehe: KURLAND et al. 1960). In Schweden richteten Hg-haltige Fungizide großen Populationschwund innerhalb der Avifauna an (JOHNELS u. WESTERMARK 1969). Aufsehen erregte auch die Entdeckung, daß der Quecksilbergehalt in Robben, Tiefsee-Thunfischen und Schwertfischen - alle weitab von der Küste gefangen - höher lag als der für Nahrungsmittel noch zulässige Grenzwert von 0,5 ppm (festgesetzt von der US Food and Drug Administration sowie von der World Health Organization). Die Verteilung von Quecksilber in der Umwelt ist sehr unterschiedlich. Auffallend hohen Gehalt an Hg zeigen Bodensedimente eutropher Seen (bis zu 1800 ppm), wo das Quecksilber meist organisch-gebunden vorliegt. Auch Kulturböden der Landwirtschaft enthalten mehr Quecksilber als andere Böden aufgrund der Anwendung Hg-haltiger Fungizide als Saat-Reizmittel. Die Hg-Verteilung in solchen Sedimenten und Böden ist abhängig von geochemischen Faktoren wie pH und organischen Anteilen sowie auch von mikrobieller Besiedlung (JENSEN u. JERNELÖV 1969, JERNELÖV 1970). Solange die persistenten fungiziden Organo-Quecksilberverbindungen im Pflanzenschutz eingesetzt wurden (bis 1966), resultierte der Hg-Gehalt der Seen, Ästuare und Meere hauptsächlich aus erodiertem abgeschwemmten Kulturbodenmaterial. Auch im marinen Bereich fand sich Quecksilber konzentriert in Sedimenten wieder, vor der kalifornischen Küste in Oberflächensedimenten bis zu 1 ppm (KLEIN u. GOLDBERG 1970). In der Oberflächenschicht von Ästuar-Bodensedimenten Sünglands wurden 0,19 - 0,64 ppm Hg nachgewiesen, tiefere Sedimentschichten enthielten dagegen 2,2 - 5,7 ppm Quecksilber (BURTON u. LEATHERLAND 1971). Der Anstieg des Hg-Gehalts in tieferliegenden Zonen eines Sediments kann durch mikrobielle Aktivität unter den reduzierenden Bedingungen dieser Zonen erklärt werden. Die Hg-Konzentrationen im freien ozeanischen Wasser sind sehr gering, für den NO-Atlantik wurde im Oberflächenwasser ein durchschnittlicher Hg-Gehalt von 51 ng/l (= 0,05 ppb) gefunden (CHESTER et al. 1973). In einigen marinen Tieren wurden dagegen Quecksilber-Konzentrationen von über 1 ppm gefunden und zwar vorwiegend in der Leber, im Gehirn und in der Niere. Wegen ihrer Lipidlöslichkeit neigen organische Hg-Verbindungen ähnlich wie polychlorierte Kohlenwasserstoffe zu hoher Anreicherung innerhalb einer Nahrungskette.

Wie Untersuchungen von HANNERZ (1968) ergaben, wird Quecksilber von Süßwasseralgen bis zum Faktor 1200 konzentriert. Invertebraten und Fische, die sich von Hg-haltigem Phytoplankton via Nahrungskette ernähren, können Konzentrationsfaktoren von 3000 bis - 8400 erreichen. Die Toxizität von Quecksilber für die Makrofauna wird also vorwiegend durch Akkumulationsprozesse innerhalb des Nahrungsnetzes bedingt.

2.2.2. Einfluß auf das Wachstum (Zellteilung)

KAMP-NIELSEN (1971) untersuchte den Einfluß von Hg-Ionen auf Photosynthese und Wachstum von *Chlorella pyrenoidosa* unter gleichen experimentellen Bedingungen, wie sie bei der Untersuchung der Cu-Toxizität angewandt wurden (siehe Zitate dort).

Die physiologischen Reaktionen unter Hg-Einwirkung waren denen ähnlich, die unter Cu-Einfluß erhalten wurden. So zeigte *Chlorella* im exponentiellen Wachstum bei einer Molarität von 0,8 ug-at Hg/l eine Verzögerung, die etwa halb so lang war wie die lag-Phase bei 0,8 ug-at Cu/l. In einem nährstoffreichen Medium verzögerten schon 3 ug Hg/l den Eintritt des exponentiellen Wachstums und hemmten dieses um etwa 50 %. Die Länge der Hg-induzierten lag-Phase war wie bei den Experimenten mit Cu abhängig vom Verhältnis: Schwermetallkonzentration/ Inoculum-Zellkonzentration. Die toxisch induzierte lag-Phase wurde also bei ansteigender initialer Zellkonzentration verkürzt.

Dies kann so interpretiert werden, daß bei steigender Zellzahl der relative Anteil Hg-besetzter Bindungsstellen an den Zelloberflächen sinkt.

Quecksilber inhibiert wie Kupfer die Zellteilung einzelliger Algen, indem es mit der Zellmembran in Wechselwirkung tritt - der genaue Mechanismus dieser Hemmung ist aber wie im Falle des Cu noch nicht aufgeklärt.

Der nach Kontamination mit Cu wie mit Hg zu beobachtende " Erholungseffekt " im Wachstum der Kulturen wird so interpretiert, daß die Zellen an ihren Membranen ausreichend 'indifferente sites' besitzen, um die toxischen Metallionen abzufangen (KAMP-NIELSEN 1971).

HANNAN u. PATOUILLET (1972) verglichen Hg, Cu, Pb, Cd und Ag in ihrer wachstumshemmenden Wirkung auf *Chlorella* und 3 marine Planktonalgen (*Phaeodactylum tricornutum*, *Cyclotella nana*, *Chaetoceros galvestonensis*).

Das Wachstum der Kulturen wurde 3 Tage lang durch Messung der Pigmentfluoreszenz (hervorgerufen hauptsächlich durch Chlorophyll a) verfolgt. Diese Methode der Zelldichte-Bestimmung scheint aber gerade bei Hg-Toxizitätstests sehr problematisch zu sein, denn wie KAMP-NIELSEN (1971) beobachtete, ändern Chlorellazellen während einer Hg-induzierten lag-Phase im Wachstum ihre Farbe in den schwach-gelblichen Bereich.

Es wurde festgestellt, daß Quecksilber von allen untersuchten Schwermetallen das Wachstum von Chlorella sowie der 3 marinen Phytoplankter am stärksten hemmte. Während bei 0,1 ppm Cd, Cu und Pb noch ein Wachstum aller Algenspezies beobachtet werden konnte, inhibierte Hg in dieser Konzentration das Wachstum aller Kulturen vollständig. Unter den 3 marinen Gattungen stellten Chaetoceros und Cyclotella in Anwesenheit von 0,1 ppm Ag-Ionen ihr Wachstum ebenfalls vollständig ein, während Silber dieser Konzentration für Phaeodactylum-Kulturen nicht toxisch war.

0,1 ppm Dimethylquecksilber führten zu einem etwas verzögerten Wachstum der 3 marinen Algen, wobei Chaetoceros am empfindlichsten reagierte. Der Befund, daß eine organische Quecksilberverbindung weniger toxisch als anorganisches Quecksilber gegenüber Algenkulturen ist, steht in Widerspruch zu anderen Untersuchungen, die Organo-Quecksilberverbindungen als wesentlich toxischer darstellen als anorganisches Quecksilber (siehe BONEY u. CORNER 1959, HARRISS 1970).

Analog zu den Ergebnissen von KAMP-NIELSEN (1971) wurde in sterilen Kulturen von Chlamydomonas reinhardi in Gegenwart von Hg-Ionen (0,1 - 1 ppm) eine Lag-Phase im Wachstum beobachtet (BEN-BASSAT et al. 1972), nach der die Algen wieder in die normale Wachstumskinetik eintraten. Bei 2 ppm wurde das Wachstum von Chlamydomonas total eingestellt.

2.2.3. Bindung an die Zellwand, Änderung der Permeabilität

Von GLOOSCHENKO (1969) wurde in angereichertem Seewasser die Akkumulation von ²⁰³Hg in der marinen Diatomee Chaetoceros costatum verfolgt, wobei die Hg-Aufnahmeraten der Zellen im Teilungsstadium, während Teilungsruhe im Licht und in der Dunkelheit sowie im abgetöteten Zustand miteinander verglichen wurden.

In der Kultur sich teilender Zellen zeigte die Hg-Aufnahme einen exponentiellen Zeitverlauf mit einer Maximalrate innerhalb der ersten 20 Stunden. Die Hg-Aufnahme von *Chaetoceros* schien nicht von photosynthetischer Aktivität abhängig zu sein, denn die Aufnahmeraten im Licht und Dunkeln waren ähnlich hoch. Zellen in der Teilungsphase akkumulierten längere Zeit als sich nicht teilende Zellen, was auf einen aktiven Aufnahmeprozess hindeutet. Mit Formalin abgetötete Zellen nahmen die größten Hg-Anteile auf. Dies kann durch Oberflächenadsorption und/oder durch im toten Zustand erhöhte Membranpermeabilität erklärt werden.

Aufgrund des geringen Unterschieds der initialen Aufnahmerate teilungsaktiver und teilungsinaktiver Zellen sowie der gleichen Aufnahmerate im Licht und in der Dunkelheit von teilungsinaktiven Zellen wird in dieser Arbeit angenommen, daß hauptsächlich eine Oberflächenadsorption für die Akkumulation des Quecksilbers verantwortlich ist.

SHIEH u. BARBER (1973) untersuchten den Einfluß von Hg auf die Permeabilitätseigenschaften und den K^+ -Ionenaustausch der Zellmembran von *Chlorella pyrenoidosa*.

Die Hg-Aufnahme war lichtunabhängig, verringerte sich jedoch mit fallender Temperatur. Quecksilber wurde in einem 2-Stufen-Prozess aufgenommen: einer schnellen Aufnahmekomponente, die durch Cystein blockiert werden konnte, folgte ein langsamer Aufnahmevorgang. Bei einem Verhältnis von 7 μM Hg/ ml kompakter Zellmasse kam es zu einem starken Netto-Efflux interner K^+ -Ionen durch Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran. Zusätzlich wurde durch Quecksilber der Austausch interner Kaliumionen gegen externe stimuliert, also das K^+ -Transportsystem der Membran verändert. Methylquecksilberchlorid verursachte ebenfalls einen - wenn auch wesentlich geringeren - Austritt von Kaliumionen aus den Zellen. Außerdem inhibierte diese Verbindung die Zellatmung. Dies kann mit der besseren Passage dieser lipophilen organischen Hg-Verbindung durch die Membran zusammenhängen, wodurch CH_3HgCl mehr intracelluläre Prozesse angreift, die für die Aufrechterhaltung eines K^+ -Konzentrationsgradienten über der Zellmembran verantwortlich sind. $HgCl_2$ dagegen scheint vor Eintritt ins Zellinnere bis zur Sättigung möglicher Bindungsstellen an der Zelloberfläche adsorbiert zu werden, wodurch die Transportvorgänge der Membran erheblich beeinträchtigt werden. Der Mechanismus der Stimulierung des K^+ -Transport-

systems durch Hg-Ionen ist noch unbekannt. Bekannt ist aber, daß die Konformation mancher Enzyme durch Kontakt mit Hg-Ionen verändert wird, wobei Quecksilber bevorzugt an freie SH-Gruppen bindet (KURAMITSU 1968). Je nachdem, wo in der Struktur eines Proteins eine solche Merkaptidbildung stattfindet - ob an indifferenten oder katalytischen sites - kann es zur Stimulierung oder Hemmung der enzymatischen Aktivität kommen. Hg könnte in dieser Weise die am Kaliumtransport beteiligten Enzyme und/oder das Carrierprotein beeinflussen. Die Hemmung des Hg-stimulierten Kaliumaustausches durch niedrige Temperaturen sowie Reagentien, die den oxidativen Energiestoffwechsel hemmen (wie Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) und N,N'-di-cyclohexylcarbodiimid (DCCD)), deutet daraufhin, daß Quecksilber vor allem die Turn-over-Rate des Carriers beeinflußt, die direkt vom Energiestoffwechsel der Zelle abhängig zu sein scheint (BARBER 1968).

2.2.4. Einfluß auf die Photosynthese

KAMP-NIELSEN (1971) stellte fest, daß Quecksilber auf die Photosynthese von *Chlorella pyrenoidosa* etwa gleich stark hemmend wirkt wie Kupfer. In Kurzzeitexperimenten von 4 Stunden bei Lichtsättigung (21 kLux) verursachte Hg eine geringere Abnahme der Assimilationsrate als Cu, wogegen in Langzeitexperimenten von 21 Stunden bei Lichtsättigung beide Schwermetallionen die Photosynthese etwa um den gleichen Betrag hemmten. Auffallend war eine schwach-gelbliche Verfärbung der Chlorellazellen nach 20 Stunden Inkubation mit Quecksilber. Neben einer Membranschädigung (Efflux von Kaliumionen) scheinen Hg-Ionen während längerer Inkubationszeit ins Cytoplasma einzudringen und den Photosyntheseprozess direkt zu beeinflussen. Jedenfalls wurde nicht wie im Falle des Cu eine Anhäufung von Assimilaten in den Zellen beobachtet, sodaß der Mechanismus der Hg-induzierten Photosynthesehemmung ein anderer zu sein scheint als der für Cu postulierte.

HARRISS et al. (1970) testeten die akute Toxizität von 4 als Fungizide verwendeten Organo-Quecksilberverbindungen durch ¹⁴C-Assimilationsmessungen an der marinen Diatomee *Nitzschia delicatissima* sowie an 7 natürlichen Süßwasser-Phytoplanktonpopulationen. Die Algen wurden Konzentrationen von 0,1 - 50 ppb folgender Organo-

Quecksilberverbindungen ausgesetzt: Phenylquecksilberacetat, Methylquecksilber-Dicyandiamid, Diphenylquecksilber sowie MEMMI (= N-Methylquecksilber-1,2,3,6-tetrahydro-3,6-methano-3,4,5,6,7,7-hexachlorphthalimid). Die Kulturen wurden in einem Licht-Dunkel-Zyklus von 12 : 12 Stunden gehalten. *Nitzschia delicatissima* wurde in der logarithmischen Phase (oberhalb von $7,5 \cdot 10^7$ Zellen/l) 24 Stunden lang den Hg-Verbindungen ausgesetzt und danach die ^{14}C -Assimilation von 5 Stunden gemessen. Die Süßwasserplankter wurden gleichbehandelt, nur wählte man neben 24 Stunden noch längere Expositionszeiten von 72 und 120 Stunden.

Diphenylquecksilber erwies sich unter diesen Bedingungen am wenigsten toxisch. Bei 1 ppb der anderen 3 Hg-Verbindungen wurde eine signifikante Hemmung der Photosynthese aller Planktonalgen nachgewiesen. 50 ppb blockierten die Assimilation bereits vollständig. Ebenso wurde bei dieser Konzentration auch das Wachstum der Kulturen total eingestellt. *Nitzschia* erwies sich gegenüber den Fungiziden als der empfindlichste Organismus. Bereits eine 24 stündige Einwirkung von 0,1 ppb der 3 Organo-Quecksilberverbindungen auf diese Diatomee führte zu einem geringen Absinken der Photosyntheserate. Auch die Photosynthese der Planktonalgen aus dem Süßwasser wurde bereits durch 0,1 ppb der 3 organischen Hg-Verbindungen nach 120 Stunden Inkubation beeinträchtigt.

Diesen Befunden zufolge sind einige kommerziell als Fungizide eingesetzte organische Hg-Verbindungen wesentlich phytotoxischer als anorganisches Quecksilber. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß das US Büro für Wasserhygiene sowie sowjetische Behörden einen tolerablen Grenzwert von 5 ppb Quecksilber für Trinkwasser angeben (J. Amer. Water Works Association, 1970, p. 285).

2.2.5. Biotransformation in eine flüchtige Form

BEN-BASSAT et al. (1972) machten erstmalig die interessante Beobachtung, daß der totale Hg-Gehalt eines Kultursystems (= Medium und Zellen) im Verlaufe des Algenwachstums zurückging. Während der Hg-Gehalt eines Mediums ohne Algen aufgrund des hohen Dampfdrucks von Quecksilber innerhalb von 8 Tagen um 5 % abnahm, betrug der Hg-Verlust bei Anwesenheit teilungsaktiver Algen in der gleichen Zeit etwa 40 %. Die Anwesenheit wachsender Algenkulturen scheint demnach einen Teil des Quecksilbers in eine flüchtige Form umgewandelt zu haben, sodaß er dem Gesamtsystem verloren ging.

In einer detaillierten Arbeit zu diesem Problem (BEN-BASSAT u. MAYER 1975) wurde die Verteilung von ^{203}Hg in den 3 Fraktionen: Wachstumsmedium, Chlorella-Zellmasse und flüchtiger Anteil im durch die Kultur geleiteten Luftstrom untersucht. Der flüchtige Anteil des Gesamt-Quecksilbers wurde chemisch in einer gesättigten Lösung von Jod in 30% KJ-Lösung gebunden.

Die Konversionsrate des Hg zur flüchtigen Form erhöhte sich proportional zur Zelldichte der Chlorella-Kulturen. So wurde bei einer initialen Konzentration von 10^6 Zellen/l das Maximum an Konversion erzielt. Bei dieser Zelldichte wurde aufgrund biologischer Aktivität nach 9 Tagen 75 % des ursprünglich vorhandenen Quecksilbergehalts aus dem System entfernt. Im Kontrollversuch ohne Algenkultur reduzierte sich der Hg-Gehalt dagegen um 22 %.

Als Bilanz dieser Versuche wird festgestellt, daß die Hg-Konzentration zuerst im Medium schnell absinkt durch Aufnahme des Metalls in die Zellen. Während oder nach der Aufnahme in die Zellen wird Quecksilber zu einer flüchtigen Form konvertiert, sodaß der Hg-Gehalt der Zellen nach Aufnahmesättigung wieder abnimmt. Möglich ist auch, daß Quecksilber an der Oberfläche der Zellen zur flüchtigen Form konvertiert wird und diese weniger permeabel für die Zellwand ist. Die beobachtete lag-Phase im Wachstum von Chlorellakulturen nach Kontakt mit Quecksilber scheint eine Zeit zu sein, in der die metabolische Energie der Zellen hauptsächlich für Konversionsprozesse verbraucht wird. Nach Konversion und damit Verdünnung der Hg-Konzentration in Zellen und Medium können die Algen wieder ihre normale Wachstumskinetik fortsetzen. Über den Stoffwechsel des Konversionsprozesses sowie über die chemischen Eigenschaften der Konversionsprodukte ist bisher noch nichts bekannt.

2.3. Zink

2.3.1. Aufnahme und Toxizität

a) marine Benthosalgen

Die Zink-Konzentrationen im Seewasser liegen bis zu 10fach höher als die Konzentrationen anderer Schwermetalle wie Cd, Cu, Pb und Mn (KNAUER u. MARTIN 1973). ABDULLAH et al. (1972) fanden in dem stark verschmutzten Wasser der Liverpool-Bay einen Maximalwert von 47,6 $\mu\text{g Zn/l}$. Entsprechend dem relativ hohen Zinkgehalt ihrer Umgebung liegt auch der natürliche Zinkgehalt von Phytoplankton

und benthischen Algen weit höher als der anderer Spurenmetalle. Der hohe natürliche Zn-Gehalt sowie die hohe Akkumulationsrate für dieses Metall in marinen Benthosalgen ist schon frühzeitig Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen. Man hatte lange Zeit angenommen, daß die Zn-Aufnahme dieser Pflanzen direkt korreliert ist mit assimilatorischer Intensität und Wachstum und betrachtete deshalb die Kinetik der Zn-Aufnahme als einen experimentell leicht zu verfolgenden Indikator für metabolische Aktivität (BACHMANN u. ODUM 1960).

GUTKNECHT (1963) kam in seiner Untersuchung der ^{65}Zn -Aufnahme und Abgabe bei 4 Spezies mariner Benthosalgen zu dem Schluß, daß die Aufnahme und Abgabe dieses Metalls auf nichtmetabolische Ionenaustausch-Prozesse zurückzuführen sind.

Die Aufnahme wie Abgabe von ^{65}Zn zeigte bei den untersuchten Gewebestücken von Braun-, Grün- und Rotalgen eine ausgesprochene pH-Abhängigkeit. Erhöhung des pH hatte eine beschleunigte Aufnahme des Metallions zur Folge, während die Abgabe bei sinkendem pH erleichtert wurde. Diese pH-Abhängigkeit des Zink austausches mit der Umgebung wird auf die Kationenaustauscher-Eigenschaften der Zellwandsubstanzen dieser Benthosalgen zurückgeführt. Bei der Rhodophyceen *Porphyra umbilicalis* scheinen sulfonsaure Galaktane und bei *Fucus vesiculosus* und *Ulva lactuca* wahrscheinlich freie Carboxylgruppen von Algin- und Pektinsäuren die Zn^{2+} -Kationen zu binden. Besonders in der Zellwand von Phaeophyceen reichlich vorhandenen Alginaten kommt bei der Adsorption von Schwermetallen generell große Bedeutung zu, da sie gute Ionenaustauscher-Eigenschaften besitzen (PERCIVAL u. McDOWELL 1967) und unterschiedliche Affinitäten zu zweiwertigen Kationen aufweisen (HAUG 1961). GUTKNECHT stellte weiterhin fest, daß die Zn-Absorption nach Abtötung der Algen zunahm. Dieses Phänomen kann durch einen internen pH-Anstieg im Gewebe nach dem Tode erklärt werden. Dies führt zu einem höheren Dissoziationsgrad interner schwacher mehrbasischer Säuren, d.h. die Zahl verfügbarer Anionenreste für die Bindung von Kationen nimmt zu (LUNDEGARDH 1960). Wegen der allgemein hohen Stabilität von Zinkkomplexen mit verschiedenen Liganden wäre es auch möglich, daß Zink andere Kationen im toten Gewebe an vorher nicht zugänglichen Orten verdrängen kann.

Ein Anstieg der Temperatur resultierte in einem leichten Zuwachs der Zinkabgabe bei *Ulva lactuca* und *Porphyra umbilicalis*.

Licht beschleunigte ebenfalls die Desorption von Zink bei diesen beiden Algen. Auch die biologische Halbwertszeit des ^{65}Zn in den Algen wurde durch Licht verkürzt. Bei *Ulva*, die 24 Stunden lang einer Konzentration von $24 \mu\text{g Zn/l}$ ausgesetzt war, wurde eine $t_{1/2}$ von 4 Tagen im Licht und 6 Tagen in der Dunkelheit gemessen. Der Turn-over von Zink im Gewebe von *Fucus vesiculosus* ist im Licht wie in der Dunkelheit extrem lang, die biologische Halbwertszeit betrug weit über 100 Tage und konnte deshalb nicht mehr eindeutig bestimmt werden.

Diese Lichtabhängigkeit des Zink austausches deutet daraufhin, daß auch metabolische Prozesse an der Aufnahme und Abgabe des Metalls beteiligt sind. Es konnte im Gewebe von *Fucus* und *Ulva* nach 12 stündiger Belichtung ein leichter Anstieg des pH festgestellt werden. Möglicherweise kann ein solcher lichtbedingter Anstieg des internen pH neben den schon erwähnten Ladungsänderungen interner Ionenaustauscher-Substanzen auch zu einer Erhöhung des plasmatischen DONNAN-Potentials führen und somit die Kationenabsorption begünstigen (LUNDEGARDH 1960).

Der natürliche Zinkgehalt der von GUTKNECHT untersuchten benthischen Algen variierte stark zwischen den verschiedenen Familien. Die Phaeophyceae *Fucus* zeigte mit 829 mg Zn/kg Trockengewicht den höchsten Zinkgehalt sowie auch den höchsten Konzentrationsfaktor von 6900. Die Chlorophyceae *Ulva* enthielt 432 mg Zn/kg Trockengewicht und konzentrierte das Metall um den Faktor 4100, wogegen die Rhodophyceae *Porphyra* nur 123 mg Zn/kg Trockengewicht enthielt mit einem Konzentrationsfaktor von 1200.

BRYAN (1969) untersuchte die Absorption und Toxizität von Zink gegenüber der Phaeophyceae *Laminaria digitata*. Gewebestücke von *Laminaria*, die unter kontinuierlicher Beleuchtung etwa einen Monat lang Zn-Konzentrationen von $1 - 500 \mu\text{g/l}$ ausgesetzt waren, zeigten oberhalb von $100 \mu\text{g Zn/l}$ deutliche Wachstumshemmung. Das Metall wurde kontinuierlich von dem Gewebe aufgenommen. Niedrige Zn-Konzentrationen der Umgebung wurden schneller aufgenommen als hohe. So wurden $2,2 \mu\text{g Zn/l}$ Medium im *Laminaria*gewebe um den Faktor 2455 konzentriert auf $5,4 \mu\text{g Zn/g}$ Gewebe. Im Gegensatz zu der Annahme von GUTKNECHT (1963 u. 1965) ist die Zinkabsorption durch *Laminaria* nicht als reiner Ionenaustausch-Prozess zu verstehen, sondern das Metall unterliegt einem Netto-Aufnahmeprozess. Ein Beweis dafür

ist die Tatsache, daß bei hohem ^{65}Zn -Gehalt der Pflanze in einem Medium ebenfalls hoher Zn-Konzentration kein wesentlicher Verlust von ^{65}Zn ins inaktive Medium festzustellen war.

In schnell wachsenden Geweben von *Laminaria* wurde 1,5fach mehr Zink absorbiert als in langsam wachsenden Pflanzenteilen. Außerdem wurde in der Dunkelheit etwa 65 % weniger Zink aufgenommen als im Licht. Diese Befunde zeigen, daß die Akkumulation von Zn stoffwechselabhängig ist. Bei hohen äußeren Zn-Konzentrationen wird diesem metabolischen Aufnahmeprozess ein nichtmetabolischer Absorptionsvorgang überlagert und hierbei scheint das Zn-Ion sehr fest an Polysaccharide und/oder Proteine des Zellwandmaterials gebunden zu werden.

b) marines Phytoplankton

HAYWARD (1969) analysierte den Zinkgehalt von *Phaeodactylum tri-cornutum*, nachdem diese marine Diatomee in einem Medium gewachsen war, das extrem hohe Konzentrationen von 6,9 bzw. 11,5 mg Zn/l enthielt. Der Zinkgehalt pro Gramm Zell-Trockengewicht war abhängig von der Zelldichte. Inkubationen von 3 bzw. $4,4 \cdot 10^6$ Zellen/l in einem Medium mit 11,5 mg Zn/l ergaben einen Zn-Gehalt pro g Algentrockenmasse von 3,6 bzw. 1,6 mg. Obwohl die absolute Zn-Konzentration innerhalb der Zellen mit steigender Zellzahl abnahm, stieg der an die Biomasse gebundene Zn-Anteil pro Volumenteil des Kulturmediums an, sodaß die Aufnahme von Zink durch eine wachsende *Phaeodactylum*-Kultur als kontinuierlicher Prozess bei entsprechend hohen äußeren Zn-Konzentrationen abläuft. *Phaeodactylum* vermag offensichtlich ohne physiologische Schäden so den größten Teil des Zink aus dem Medium zu entfernen.

Es muß hier allerdings angemerkt werden, daß die Untersuchung von HAYWARD die extrem hohe Aufnahmekapazität von *Phaeodactylum*-Zellen für Zink demonstriert, jedoch keine Aussagen über Toleranz- oder Toxizitätswerte für dieses Schwermetall macht.

RILEY u. ROTH (1971) ließen 15 verschiedene Phytoplankton-Spezies - darunter mehrere marine Arten - in einem Nährmedium wachsen, das hohe Konzentrationen von 18 verschiedenen Spurenmetallen enthielt, die als Chelatkomplexe vorlagen. Nach 20 - 30 Tagen Wachstum wurden die Kulturen geerntet und die Verteilung der Spurenelemente pro Plankton-Trockenmasse untersucht.

Zink, das sich in einer exzessiven Konzentration von 60 mg/l in der Nährlösung befand, wurde unterschiedlich stark von den einzelnen Spezies angereichert. Der Zn-Gehalt der Xanthophyceae *Olisthodiscus* entsprach mit 75 ppm etwa der Umgebungskonzentration (60 ppm), wogegen die Cryptophyceae *Hemiselmis* einen Zn-Gehalt von 480 ppm aufwies. *Phaeodactylum tricornutum* enthielt mit 325 ppm (= 0,325 mg/g Trockenmasse) einen bedeutend geringeren Zinkgehalt als er von HAYWARD (s.o.) für diese Diatomee gefunden wurde, obwohl beide Untersuchungen mit ähnlich zusammengesetzten Medien und vergleichbaren Zelldichten ausgeführt wurden.

Zur Untersuchung der Belastbarkeit der natürlichen Lebensgemeinschaft von Fjordwasser durch Zink-Kontamination bestimmten JENSEN et al. (1974) die Toleranzgrenzen dieses Metalls für die 3 marinen Diatomeen *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana* und *Phaeodactylum tricornutum* in einer Dialyse-Kulturtechnik. Dabei wurde 30 m tiefes Seewasser aus dem Fjord durch Dialyse-Tanks gepumpt, in denen das Phytoplankton kultiviert wurde (Einzelheiten zur Dialyse-Kulturtechnik: siehe JENSEN et al. 1972). Teile dieses Wassers wurden in konstanten Portionen in Mischkammern geleitet, in denen Magnetrührer für Turbulenz sorgten. Ebenso wurden ZnCl_2 -Lösungen mit peristaltischen Pumpen in diese Mischkammern eingeschleust worauf das Zn-haltige Fjordwasser mit einer Rate von 400 l/Tag durch die Dialyse-Kulturtanks geleitet wurde. Der Zinkgehalt des Seewassers wurde durch Atomabsorption bestimmt.

Zur Bestimmung der Zn-Akkumulation ließ man die Algen in Dialysenkammern im Seewasser rotieren, wobei Zink in Mengen von 0, 25, 250, 500, 1000 und 10 000 $\mu\text{g/l}$ eingesetzt wurde. Das Kulturwachstum wurde nach 11 - 15 Tagen durch Zählung bestimmt, die Zellen durch Filtration durch Millipore Filter (0,8 μ) geerntet, mit Seewasser gewaschen und zusammen mit dem Filter bei 420° Celsius verascht. Der Zinkgehalt der Asche wurde mit der Neutronen-Aktivierungsanalyse bestimmt.

Unter diesen Bedingungen vertrug *Skeletonema costatum* nicht mehr als 25 $\mu\text{g Zn/l}$ im Wachstum im Gegensatz zu *Thalassiosira pseudonana*, deren normale Zellteilungsraten erst bei 250 $\mu\text{g Zn/l}$ schwach zurückgingen. Kulturen von *Phaeodactylum tricornutum* wuchsen noch bei 10 mg Zn/l normal und selbst 25 mg Zn/l ergaben erst einen

Rückgang der Zellteilungsrate von etwa 20 %. 2 Klone von *S. costatum*, die aus verschiedenen Fjorden isoliert wurden, reagierten in ihrem Wachstum unterschiedlich auf die gleiche Konzentration des Schwermetalls. Während das Wachstum des einen Klon in Gegenwart von 500 µg Zn/l nach 2 Generationen schnell abnahm, wurde das Wachstum des anderen Klon bei dieser Zn-Konzentration zwar um 70 % reprimiert, jedoch kontinuierlich fortgesetzt.

Die Akkumulationsraten von Zink nahmen bei allen 3 untersuchten Diatomeen mit steigender Konzentration des Schwermetalls im Seewasser zu. Mit Abstand zeigte *P. tricornutum* auch hier eine bemerkenswert hohe Zink-Verträglichkeit. Der Zn-Gehalt dieser Alge stieg, nachdem sie in Seewasser von 10 mg Zn/l gewachsen war, fast um das 200fache des Kontrollwertes an.

Die Dialyse-Kultur bietet gegenüber der Batch-Kultur bei Messungen der Schwermetall-Toxizität gegenüber Phytoplankton einige bedeutende Vorteile. Vor allem wird durch diese Kulturtechnik erreicht, daß trotz der großen Aufnahmekapazität mancher Algen für Schwermetalle die Kulturen dauernd einer konstanten äußeren Konzentration des untersuchten Schwermetalls unterliegen. Wie HAYWARD (1969) zeigen konnte, vermag eine *Phaeodactylum*-Kultur im Batch-System nach längerer Zeit fast das gesamte Zink aus dem Kulturmedium zu entfernen. JENSEN et al. (1974) konstatierten dagegen bei Zn-Analysen ihres Dialyse-Kulturmediums einen über 12 Tage andauernden konstanten Zinkgehalt. Weiterhin werden die Algenkulturen bei Dialysetechnik allen im Seewasser vorkommenden Substanzen, die die Schwermetall-Toxizität beeinflussen können, kontinuierlich ausgesetzt, sodaß die erhaltenen Ergebnisse eher den tatsächlichen Verhältnissen am natürlichen Standort entsprechen.

c) Süßwasser-Phytoplankton

COLEMAN et al. (1971) prüften in bakterienfreien Kulturen der Süßwasseralgen *Pediastrum tetras*, *Euglena viridis* und *Chlorella vulgaris* den Einfluß von Zink auf das Wachstum sowie die Aufnahme und Akkumulation dieses Metalls.

Der normale Spurenmetallgehalt des Nährmediums betrug im Falle des Zink 1,88 mg Zn/l. Dieser Zn-Gehalt wurde für die Tests erhöht um die Faktoren 2, 4, 10 und 20 und die resultierenden Zinkwerte betrugen auf der Basis von Atomabsorptions-Analysen: 4,2/8,7/18 und 35,5 mg/l. Vor Inokulation der Algenkulturen wurden die Nährmedien

bei 121° Celsius 20 min. lang autoklaviert und das Trockengewicht eines jeden Kultur-Inoculums bestimmt. Im Test wuchsen die Kulturen in einem Licht-Dunkel-Zyklus von 15 : 9 Stunden 3 Wochen lang.

Anschließend wurde als Maß für die Wachstumsrate die Zunahme des Gesamt-Trockengewichts einer Algenkultur bestimmt.

Die 2fache Zn-Konzentration (= 4,2 mg/l) führte bei allen 3 Algen-spezies zu einer deutlichen Wachstumssteigerung. Die 4fache Kon-zentration von Zink reprimierte dagegen das Wachstum von Chlorella und Euglena, wobei *Pediastrum* etwa dasselbe Wachstum zeigte wie im Normalmedium (= 1,88 Mg Zn/l). Bei höheren Zn-Konzentrationen von 18 und 35,5 mg/l ging das Wachstum von *Pediastrum* und *Euglena* zurück, während erstaunlicherweise das Wachstum von *Chlorella vul-garis* bei diesen extremen Konzentrationen gegenüber dem Kontroll-wert (= 1,88 mg Zn/l) deutlich zunahm.

Alle 3 Spezies akkumulierten Zink proportional zur ansteigenden Konzentration des Metalls im Medium. Die Konzentration von Zn/ mg Zell-Trockengewicht variierte von 0,1 ug (bei 1,88 mg Zn/l) bis 80 ug (bei 35,5 mg Zn/l). Von den 3 untersuchten Spezies nahm *Euglena viridis* die größten Zinkmengen auf. Bei hohen äußeren Zn-Konzentrationen erhöhte sich auch der Konzentrationsfaktor, sodaß ein exponentielles Anwachsen der Zn-Akkumulationsrate bei diesen Phytoplanktern beobachtet werden konnte. SCHAEDELE u. JACOBSON (1967) nehmen an, daß gewisse Strukturelemente innerhalb von Chlorella-zellen Ionenaustauscher-Eigenschaften besitzen. Möglicherweise beruht die hier nachgewiesene hohe Akkumulation des Zn-Ions in Planktonalgen auf ähnlichen Prozessen, wie sie für Benthosalgen unter 2.3.1.a) beschrieben worden sind.

Die prozentuale Aufnahme eines Metalls durch Algenkulturen läßt sich angeben durch den Quotienten: Metallgewicht der Zell-Trocken-masse/ Metallgewicht im Medium zu Beginn des Versuches. Solche Wer-te sind hauptsächlich abhängig vom Trockengewicht der Zellmasse (also der Wachstumsintensität) und der Aufnahmekapazität (= ug Me-tall/mg Zell-Trockengewicht). Die prozentuale Zn-Aufnahme von *C.vul-garis* betrug im Medium 10facher Zn-Konzentration fast 40 %, wogegen *Pediastrum* und *Euglena* bei gleicher Konzentration 10 - 15 % auf-nahmen.

Zur Testung physiologischer Reaktionen schwermetall-kontaminierter Algenkulturen ist die Bestimmung des Algenwachstums durch Wägung der Zellmasse problematisch, wenn nicht gleichzeitig auch der

Gesamt-Chlorophyllgehalt als Referenzwert mitbestimmt wird. Andernfalls könnten z.B. Akkumulationserscheinungen auch auf einer Zunahme von abgestorbenen Zellen in der Kultur beruhen, die nach CUSHING u. WATSON (1968) das Zn-Ion schneller aufnehmen als lebende Zellen.

2.4. Kobalt

2.4.1. Aufnahme und Toxizität

Im der oben zitierten Arbeit von COLEMAN et al. (1971) wurde neben Zink auch der Einfluß von Kobalt auf die 3 Süßwasseralgen untersucht. Die Co-Konzentration des normalen Nährmediums betrug 0,04 mg/l, sie wurde für die Tests erhöht um die Faktoren 10, 50, 100 und 150 und die resultierenden Kobaltwerte betrugen auf der Basis von Atomabsorptions-Analysen: 0,55/ 1,55/ 2,67 und 2,88 mg/l. Im Gegensatz zu den Ergebnissen beim Zink reduzierten alle Co-Konzentrationen, die über dem Gehalt des Normalmediums (= 0,04 mg Co/l) lagen, das Wachstum der 3 Algenkulturen.

Obwohl Co ein lebenswichtiges Spurenelement für die Mehrzahl der Algen ist, liegt sein Toleranzwert ähnlich wie beim Spurenelement Cu offensichtlich sehr niedrig. Auch MAYZAUD u. MARTIN (1975) konnten bei der Spurenmetall-Analyse von marinem Phytoplankton im Gegensatz zu anderen Schwermetallen nur Spuren von Kobalt nachweisen. Möglicherweise kann die Toxizität größerer Co-Konzentrationen auf eine Störung des Fe-Metabolismus der Algen zurückgeführt werden (STEWARD 1963).

Analog zum Zink stieg auch der Konzentrationsfaktor für Kobalt mit zunehmender äußerer Metallkonzentration an. *Euglena viridis*, deren Aufnahmekapazität für Co unter den 3 Spezies am höchsten war, erreichte für das Co-Ion ähnlich hohe Konzentrationsfaktoren wie für Zn (Maximalwerte bei jeweils höchster äußerer Metallkonzentration: 2446 für Co und 2281 für Zn).

Obwohl das Wachstum aller 3 Phytoplankter in Gegenwart von 2,88 mg Co/l stark zurückging (um etwa 50 %), wurden unter diesen Bedingungen die höchsten prozentualen Aufnahmen des Schwermetalls erzielt. Für die 3 Phytoplankton-Kulturen lag die höchste prozentuale Aufnahme von Kobalt im Bereich von 5 - 7 %.

2.5. Chrom

2.5.1. Einfluß auf Wachstum und Photosynthese

Im Laboratorium wird häufig zum Reinigen von Glasgeräten Dichromat-Schwefelsäure verwendet. Auch vor Produktivitätsmessungen mit der ^{14}C -Methode wird von STRICKLAND u. PARSONS (1968) eine Reinigung der Gefäße mit Dichromat-Schwefelsäure empfohlen. Aber bereits LAUGH (1934) wies nach, daß auf solche Weise gereinigte Glasgeräte noch nach mehrmaligem Waschen nachweisbare Mengen von Cr(VI) an der Oberfläche enthalten.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit einzelliger Algen gegenüber Schwermetallen wie Cu und Hg wurde von WIUM-ANDERSEN (1974) an *Chlorella pyrenoidosa* und *Nitzschia palea* geprüft, ob auch das sechswertige Chrom auf Photosynthese und Wachstum schon in geringsten Konzentrationen toxisch wirken kann. Dabei wurden ähnliche experimentelle Bedingungen eingehalten, wie sie im Falle der Cu-Toxizitätstests von STEEMANN NIELSEN u. WIUM-ANDERSEN (1970) gewählt wurden, wobei vor allem die geringe Fe-Konzentration im Medium von nur 2,4 $\mu\text{g/l}$ hervorgehoben werden muß.

Nitzschia palea wurde in einem Licht-Dunkel-Zyklus von 12 : 12 Stunden und *Chlorella pyrenoidosa* unter kontinuierlicher Beleuchtung kultiviert. Chrom wurde in seiner sechswertigen Form als $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ oder CrO_3 den Kulturen beigegeben.

Das Wachstum von *N. palea* wurde bei einer initialen Zellkonzentration von $10^5/\text{l}$ durch 150 $\mu\text{g Cr/l}$ deutlich gehemmt. Bei einer initialen Zelldichte von 10^7 Zellen/l führten 150 $\mu\text{g Cr/l}$ zu einer 2 tägigen Verzögerung des Wachstums, danach wuchs die Kultur wieder normal weiter. 300 $\mu\text{g Cr/l}$ hemmten das Wachstum dauerhaft innerhalb des Versuchszeitraums von 4 Tagen. Eine Erhöhung der Fe-Konzentration im Medium führte nicht zu einer Abschwächung der Chrom-Toxizität, wie es bei der Untersuchung der Cu-Toxizität der Fall gewesen war.

Die Photosynthese von *N. palea* wurde durch 1 mg Cr/l um 70 % reduziert. Auch hier erwies sich Chrom im Vergleich zu Kupfer als weitaus weniger toxisch. Eine 50%ige Hemmung der Photosyntheserate von *Chlorella* wurde durch 5 mg Cr/l verursacht, während bei der Diatomee *Nitzschia palea* bereits 800 $\mu\text{g Cr/l}$ genügen, um den gleichen Rückgang der Assimilationsrate zu erhalten.

2.6. Nickel

2.6.1. Aufnahme in Abhängigkeit vom metabolischen Zustand

SKAAR et al. (1974) untersuchten die Nickel-Aufnahme in Zellen von *Phaeodactylum tricornutum*. Die Kulturen wurden in einem künstlichen Seewassermedium, das Spurenelemente und Chelatbildner enthielt, bei 12° Celsius und 3000 Lux kontinuierlicher Beleuchtung in siliconisierten Behältern gehalten. Die Medien wurden vor den Messungen filtersterilisiert und die Ni-Aufnahme mit trägerfreiem ^{63}Ni verfolgt.

Das Wachstum von *P. tricornutum* wurde erst ab einer Konzentration von 1 mg Ni/l beeinträchtigt.

Die Nickelaufnahme verlief linear-abhängig von der äußeren Konzentration im Bereich von 0,05 - 1 $\mu\text{g Ni/l}$ Medium. Innerhalb einer Zeit von 4 Tagen, in der sich die Kultur von 1,6 auf $3,3 \cdot 10^9$ Zellen pro Liter verdoppelt hatte, wurden weniger als 10 % der angebotenen Nickelmenge von den Zellen aufgenommen.

Die in die Zellen aufgenommene Nickelmenge erreichte bei einer Zelldichte von $25 \cdot 10^8$ Zellen/l innerhalb der ersten 10 Stunden ein Maximum. Darauf erfolgte eine langsame Abgabe des Metalls an das Medium im Verlauf von 3 Tagen. Hierbei wurde die Nickelmenge in den Zellen auf 1/3 des Maximalwertes reduziert. Bei einer 10fach geringeren Zelldichte wurde erst nach ca. 60 Stunden der maximale Aufnahmewert erreicht, der anschließende Nickelverlust betrug aber nur etwa 40 % vom Maximalwert.

Dies deutet daraufhin, daß bei hoher Zellkonzentration die initiale Aufnahmerate entsprechend hoch ist, jedoch die Aufnahmekapazität geringer als bei niedrigen Zellkonzentrationen.

Die Aufnahmefähigkeit von *Phaeodactylum*-Zellen für Ni-Ionen ist abhängig von der Phosphatversorgung der Zellen. So wird die Aufnahme des Schwermetalls sehr gesteigert, wenn die Kulturen vorher Phosphat akkumuliert hatten. Dagegen nahmen Zellen, die zuvor in P-freiem Medium aufgewachsen waren und dann gleichzeitig mit Phosphat und Nickel in Kontakt kamen, nur geringe Mengen des Metalls auf. Etwa 48 Stunden nach begonnener Phosphataufnahme zeigten die Kulturen die höchste Aufnahmekapazität für Ni-Ionen.

Die Phosphatakkumulation von *Phaeodactylum tricornutum* führt zur intracellulären Speicherform Polyphosphat. Ni-Ionen beeinträchtigten die Phosphatakkumulation nicht.

Ein Teil des von den Zellen aufgenommenen Nickels ging nach Suspension der Kulturen in verschiedenen Ni-freien Medien bis auf einen konstanten Restgehalt verloren, der offensichtlich stärker zellgebunden zu sein scheint.

Die Aufnahme des Nickels basiert wahrscheinlich auf 2 unterschiedlich ablaufenden Prozessen: einer langsamen Aufnahme mit niedriger Bindungskapazität und einer schnellen Aufnahme mit hoher Bindungskapazität, die direkt vom Phosphat-Metabolismus abhängt.

2.7. Arsen

2.7.1. Aufnahme und Austausch

Die Absorption von Arsen als Arsenat-Ion durch *Chlorella* wurde von JEANJEAN et al. (1971) mit $^{76}\text{AsO}_4^{3-}$ verfolgt.

Das Arsenat wurde schnell von den Zellen aufgenommen und nach 30 Minuten war ein Gleichgewichtszustand erreicht zwischen Aufnahme und Abgabe. Der zeitliche Verlauf der Arsen-Aufnahme war unabhängig von der Arsen-Konzentration des Mediums im Bereich von 10 - 1000 $\mu\text{M/l}$.

Aus den Messungen der Absorption des Ions bei Inkubationstemperaturen von 1° und 29° Celsius errechnete sich ein Q_{10} -Wert für das Arsenat, der zwischen 1,6 und 1,7 lag.

Bei ähnlichem Q_{10} -Wert zeigte dagegen das Phosphat-Ion eine andere Aufnahmekinetik.

Die Absorption des AsO_4^{3-} scheint auf 2 verschiedenen Transportmechanismen zu beruhen, die sich durch unterschiedlich hohe Bindungskapazität für das Arsenat-Ion voneinander unterscheiden. Für das eine Transportsystem wird ein K_m zwischen 2 und 4 μM Arsenat angegeben. Das zweite Transportsystem hat dagegen mit einem 100fach größeren K_m von 200 - 300 μM eine wesentlich geringere Affinität zum Arsenat-Ion.

Chlorella konzentriert das Arsenat innerhalb der Zelle, wobei sich der Konzentrationsfaktor mit steigender externer Arsenat-Konzentration erniedrigt. Bei einer externen Arsenat-Konzentration von 10 $\mu\text{M/l}$ betrug der Konzentrationsfaktor 950, wogegen er sich bei 1000 μM Arsenat/l auf 21,2 verringerte.

Messungen des Austausches zwischen markiertem und unmarkiertem Arsenat zeigten, daß nur ein Teil des von Chlorellazellen aufgenommenen Arsenats ausgetauscht wird. Bei diesen Messungen wurden die Chlorellazellen bei 29° Celsius 30 min. lang $5 \cdot 10^{-5}$ M $^{76}\text{AsO}_4^{3-}$ ausgesetzt, anschließend zentrifugiert und in der gleichen Konzentration von unmarkiertem Arsenat resuspendiert.

Von dem intracellulär akkumulierten $^{76}\text{AsO}_4^{3-}$ hatten die Zellen nach 30 min. etwa 30 % gegen externes AsO_4^{3-} ausgetauscht.

Die Erscheinung, daß ein Teil des von Chlorella aufgenommenen Arsenats nicht oder nur sehr verzögert ausgetauscht wird, veranlaßten BLASCO et al. (1971), die chemische Natur des zellgebundenen Arsens näher zu untersuchen.

Dazu wurden Chlorellen, die 30 min. lang markiertes Arsenat aufgenommen hatten, mit Trichloressigsäure behandelt, wodurch neben einer unlöslichen Fraktion eine säurelösliche Phase erhalten wurde. Nach Abtrennung des Arsenats von anderen Arsenverbindungen als Molybdatkomplex wurde die Existenz von Arsenit papierchromatographisch in dieser Phase nachgewiesen.

Offensichtlich reduzieren Chlorellen das aufgenommene Arsenat teilweise zu Arsenit. Diese Reduktion wurde auch bei Kulturen beobachtet, die im Dunkeln gehalten wurden.

Das Arsenit in den Zellen scheint in einer noch nicht geklärten Weise schwerer austauschbar zu sein als Arsenat und/oder den Austausch des Arsenats zu behindern.

3. ZUSAMMENFASSUNG

Im der vorliegenden Studie werden die Untersuchungen der letzten Jahre über die Schwermetall-Kontamination von Phytoplankton des Süßwassers und des marinen Bereichs kurz zusammengefaßt und diskutiert. Dabei werden sowohl Untersuchungen betrachtet, die unter natürlichen Verhältnissen durchgeführt wurden, als auch Ergebnisse, die unter kontrollierten experimentellen Bedingungen in Batch-Kulturen und Dialyse-Kulturen erhalten wurden.

Einige Toxizitätstests von Schwermetallen gegenüber benthischen Algen werden ebenfalls berichtet und mit den Untersuchungen an planktischen Algen verglichen.

Gesondert betrachtet werden solche experimentellen Bedingungen, die im Pio-Assay die toxischen Effekte von Schwermetall-Ionen wesentlich beeinflussen.

Der Einfluß von Schwermetallen auf verschiedene physiologische Prozesse einzelliger und mehrzelliger Algen wird ausführlich am Beispiel des Cu, Hg, Zn, Co, Cr, Ni und As dargestellt.

Die Schwermetallbelastung natürlicher Phytoplankton-Populationen hängt neben hydrographischen Faktoren auch von produktionsbiologischen Prozessen ab.

Populationen von marinem und Süßwasser-Phytoplankton können sich bis zu einem gewissen Grade an toxische Metallkonzentrationen in ihrer Umgebung adaptieren.

Litorale Benthosalgen akkumulieren Schwermetalle in einem besonders hohen Maße, sodaß sie als Testorganismen für die Metallbelastung von Küstengewässern besonders geeignet sind.

Unter den experimentellen Bedingungen, die die Toxizität von Schwermetall-Ionen im Laborexperiment beeinflussen, sind vor allem komplexierende Agentien im Nährmedium, der pH-Wert und die Belichtungsverhältnisse von Bedeutung.

Alle untersuchten Schwermetalle werden von einzelligen Algen unterschiedlich stark akkumuliert, was jedoch nicht in jedem Falle zu einer Schädigung des Stoffwechsels der Algen führt. Schwermetall-Ionen werden zu einem beträchtlichen Teil von den Zelloberflächen der Algen durch Ionenaustausch-Prozesse absorbiert und scheinen erst bei exzessiven Konzentrationen ins Zellinnere zu penetrieren.

Freie Cu^{2+} - und Hg^{2+} -Ionen erweisen sich gegenüber einzelligen Algen als hochtoxisch, wobei beide Schwermetalle vor allem das Wachstum und die Assimilation reprimieren. Der primäre Angriffsort von Cu und Hg ist die Zellwand der Algen. Durch eine Schädigung der Zellwand wird offenbar indirekt die Zellteilung sowie die Photosyntheserate beeinträchtigt. Die Zellatmung wird dagegen erst bei hohen Metallkonzentrationen signifikant beeinflusst.

Organische Hg-Verbindungen, die häufig als Fungizide im Handel sind, zeigen eine wesentlich höhere Toxizität gegenüber marinem und Süßwasser-Phytoplankton als anorganisches Quecksilber.

Einzellige Algen transformieren einen Teil des aufgenommenen Quecksilbers in eine leicht flüchtige Form.

Zink wird von Benthosalgen sowie von einzelligen Planktonalgen in höherem Maße konzentriert als andere Schwermetalle. Die Zn-Aufnahme beruht vorwiegend auf nichtmetabolischen Ionenaustausch-Prozessen, zusätzlich scheint aber auch eine metabolische Aufnahme dieses Schwermetalls stattzufinden.

Auch aus Dialyse-Kulturversuchen an Planktonalgen liegen bereits Ergebnisse über die Aufnahme und Toxizität von Zink vor.

Für Planktonalgen scheint der Toleranzwert für Kobalt wie im Falle des Spurenelements Kupfer sehr niedrig zu liegen. Der natürliche Co-Gehalt von Phytoplankton liegt weitaus niedriger als der anderer essentieller Schwermetalle.

Chrom(VI) hemmt bei einzelligen Algen das Wachstum und die Photosynthese, allerdings weitaus schwächer als Kupfer oder Quecksilber.

Die Aufnahme von Nickel und Arsen (als Arsenat-Ion) durch einzellige Algen beruht auf 2 verschiedenen Transportprozessen.

Die Ni-Aufnahme ist abhängig vom Phosphat-Metabolismus der Zellen. Vom den Algen aufgenommenes Arsenat wird zu einem bestimmten Teil ausgetauscht. Innerhalb der Zellen wird akkumuliertes Arsenat zu Arsenit reduziert.

ABSTRACT

Heavy metal contamination of phytoplankton under natural conditions and in laboratory culture systems.

- A Review -

In the present paper the investigations of recent years on heavy metal contamination of freshwater and marine phytoplankton are reported and discussed. These investigations not only concern the results of field experiments but also those gained from laboratory batch cultures as well as dialysis cultures.

Some toxicity tests of heavy metals on benthic algae are also reported and compared with the results of investigations on phytoplankton.

Furthermore, such experimental conditions are considered which are affecting substantially the toxic effects of heavy metal ions in a bio-assay.

The effect of heavy metal ions on various physiological processes in unicellular and multicellular algae are reported in detail in respect of copper, mercury, zinc, cobalt, chromium, nickel and arsenic.

The heavy metal contamination of natural phytoplankton populations is dependent on hydrographical factors as well as on processes of biological productivity.

Marine and freshwater phytoplankton populations are adaptable, to a certain degree, to toxic metal concentrations in the water. Benthic algae of the littoral region accumulate heavy metal ions to an exceptionally high degree so that they are especially suitable to be used as test organisms for the investigation of heavy metal pollution of coastal waters.

The most important experimental factors affecting the metal toxicity in laboratory culture systems are the presence of complexing agents in the nutrient, the pH value and the illumination conditions.

All the heavy metal ions tested are accumulated by unicellular algae, although to a different degree, but not necessarily with deleterious effects on the metabolism of the algae. An important

amount of the metal ions present in the culture solution is absorbed by the surface of the algae cells in a ion-exchange process and the ions seem to penetrate into the interior of the cells only in case of excessively high metal ion concentrations.

Free Cu^{2+} and Hg^{2+} ions are highly toxic to unicellular algae whereby both these ions are causing a depression of the growth and the assimilatory activity. The first toxic effect is a damage of the cell wall by both these metal ions which apparently causes by an indirect effect a depression of the cell division and photosynthetic activity. The respiration of the cells, however, is restricted only by high concentrations of these metal ions.

Organic mercury compounds, often used as commercial fungicides, show a remarkably higher toxic effect on marine and freshwater phytoplankton than inorganic mercury.

Some of the mercury absorbed by unicellular algae is being transformed by them into a volatile form.

Benthic algae as well as marine and freshwater phytoplankton algae are concentrating zinc to a higher degree than other heavy metal ions. The zinc-uptake is mainly due to a non-metabolic ion-exchange process but in addition a metabolic uptake of this metal seems to take place.

Also from dialysis culture experiments on planktonic algae results of the uptake and toxicity of zinc have been obtained.

The tolerance level of phytoplankton for cobalt concentrations seems to be very low as is the case with the trace metal copper. The natural content of cobalt in phytoplankton is the lowest of all the other essential heavy metals.

Chromium(VI) inhibits the growth and photosynthesis of unicellular algae although the deleterious effects are by far weaker than in the case of copper or mercury.

The uptake of nickel and arsenic (as arsenate ion) is based on two different transport mechanisms.

The Ni-uptake is dependent on the phosphate metabolism of the cells. Unicellular algae accumulate arsenate and to some extent an exchange with external arsenate is observed. Some of the arsenate within the cells is reduced to arsenite.

4. Literatur-Zitate

- ABDULLAH, M.J., ROYLE, L.G. & MORRIS, A.W. 1972:
Heavy Metal Concentration in Coastal Waters, *Nature*, 235, 158-160
- BACHMANN, R.W. & ODUM, E.P. 1960:
Uptake of ⁶⁵-Zn and primary productivity in marine benthic algae,
Limnol. Oceanogr., 5, 349-355
- BANK, O. 1962:
Algen, ihre Bekämpfung mit chemischen Mitteln, *Der Fischwirt*, 12, 260-69
- BARBER, J. 1968:
The efflux of potassium from *Chlorella pyrenoidosa*, *Biochim. Biophys. Acta*, 163, 531-538
- BARBER, R.T. & RYTHER, J.H. 1969:
Organic chelators: factors affecting primary production in the Cromwell-Current upwelling, *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 3, 191-199
- BARTSCH, A.F. 1954:
Practical methods for control of algae and water weeds, *Public Health Report*, 69, 749-57
- BEN-BASSAT, D., SHELEF, G. GRUNER, N. & SHUVAL, H.J. 1972:
Growth of *Chlamydomonas* in a Medium containing Mercury, *Nature*, 240, 43-44
- BEN-BASSAT, D. & MAYER, A.M. 1975:
Volatilization of Mercury by Algae, *Physiol. Plant.*, 33, 128-132
- BLASCO, F., GAUDIN, C. & JEANJEAN, R. 1971:
Absorption des ions Arseniate par les Chlorelles. Reduction partielle de l'arseniate en arsenite, *Comptes Rendus Acad. Sc. Paris t* 273, 812-15
- BONEY, A.D., CORNER, E.D.S. & SPARROW, B.W.D. 1959:
The effect of various poisons on the growth and viability of sporelings of the red alga *Plumaria elegans*, *Biochem. Pharmacol.*, 2, 37-49
- BONEY, A.D. & CORNER, E.D.S. 1959:
Application of toxic agents in the study of the ecological resistance of intertidal red algae? *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 38, 267-275
- BONEY, A.D. 1971:
Sublethal effects of mercury on marine algae, *Mar. Poll. Bull.*, 2, 69-71
- BOWEN, H.J.M. 1956:
Strontium and barium in sea water and marine organisms, *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 35, 451-460
- BOWEN, H.J. 1966:
Trace elements in biochemistry. Academic Press New York
- BRYAN, G.W., PRESTON, A. & TEMPLETON, W.L. 1966:
Accumulation of radionuclids by aquatic organisms of economic importance in the United Kingdom, in: *Disposal of Radioactive Wastes in Seas, Oceans and Surface Waters*, pp. 623-37, I.A.E.A., Wien

- BRYAN, G.W. 1969:
The absorption of zinc and other metals by the brown seaweed *Laminaria digitata*, J.mar.biol.Ass.U.K., 49, 225-243
- BURROWS, E.M. 1971:
Assessment of pollution effects by the use of algae, Proc.Roy.Soc. London B, 177, 295-306
- BURTON, J.D. & LEATHERLAND, T.M. 1971:
Mercury in a Coastal Marine Environment, Nature, 231, 440-441
- CHESTER, R., GARDNER, D., RILEY, J.P. & STONER, J. 1973:
Mercury in some surface waters of the World Ocean, Mar.Poll.Bull., 4, 28-29
- COLEMAN, R.D., COLEMAN, R.L. & RICE, E.L. 1971:
Zinc and Cobalt Bioconcentration and Toxicity in Selected Algal Species, Bot.Gaz., 132(2), 102-109
- CUSHING, C.E. & WATSON, D.G. 1968:
Accumulation of ³²-P and ⁶⁵-Zn by living and killed plankton, Oikos, 19, 143-145
- DAVEY, E.W., GENTILE, J.H., ERICKSON, S.J. & BETZER, P. 1970:
Removal of Trace Metals from Marine Culture Media, Limnol.Oceanogr., 15, 486-488
- EDWARDS, P. 1972:
Cultured Red Alga to Measure Pollution, Mar.Poll.Bull., 3, 184-188
- ERICKSON, S.J., LACKIE, N. & MALONEY, T.E. 1970:
A Screening Technique for the Estimating Copper Toxicity to Estuarine Phytoplankton, J.Wat.Poll.Control Federation, 42, R 270-78
- ERICKSON, S.J. 1972:
Toxicity of Copper to *Thalassiosira pseudonana* in unenriched inshore seawater, J.Phycol., 8, 318-323
- FÄNGSTRÖM, I. 1972:
The effects of some chelating agents and their copper complexes on photosynthesis in *Scenedesmus quadricauda*, Physiol.Plant., 27, 389-97
- FITZGERALD, G.P. & FAUST, S.L. 1963:
Factors affecting the algicidal and algistatic properties of copper, Appl.Microbiol., 11, 345-351
- FUJITA, T. 1971:
Concentration of major chemical elements in marine plankton, Geochem. J., 4, 143-156
- GLOOSCHENKO, W.A. 1969:
Accumulation of ²⁰³-Hg by the marine diatom *Chaetoceros costatum*, J.Phycol., 5, 224-226
- GUTKNECHT, J. 1963:
⁶⁵-Zn uptake by benthic marine algae, Limnol.Oceanogr., 8, 31-38

- GUTKNECHT, J. 1965:
Uptake and retention of cesium 137 and zinc 65 by seaweeds, *Limnol. Oceanogr.*, 10, 58-66
- HANNAN, P.J. & PATOUILLET, C. 1972:
Effect of Mercury on Algal Growth Rates, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 14, 93-101
- HANNERZ, L. 1968:
Experimental investigations on the accumulation of mercury in water organisms, Report No. 48, 120-76, Inst. Freshwater Res. Drottningholm, Sweden
- HARRISS, R.C., WHITE, D.B. & MACFARLANE, R.B. 1970:
Mercury compounds reduce photosynthesis by plankton, *Science*, 170, 736-37
- HARRISS, R.C. 1971:
Ecological Implications of Mercury Pollution in Aquatic Systems, *Biological Conservation*, 3 (No. 4), 279-283
- HASSALL, K.A. 1967:
Inhibition of Respiration of *Chlorella vulgaris* by Simultaneous Application of Cupric and Fluoride Ions, *Nature*, 215, 521
- HASSALL, K.A. 1969:
An asymmetric respiratory response occurring when fluoride and copper ions are applied jointly to *Chlorella vulgaris*, *Physiol. Plant.*, 22, 304-311
- HAUG, A. 1961:
The affinity of some divalent metals to different types of alginates, *Acta chem. scand.*, 15, 1794-5
- HAYWARD, J. 1969:
Studies on the Growth of *Phaeodactylum tricornutum*. V. The Relationship to iron, manganese and zinc, *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 49, 439-46
- HOPKINS, R. & KAIN, J.M. 1971:
The effect of marine pollutants on *Laminaria hyperborea*, *Mar. Poll. Bull.*, 2, 75-77
- JAHN, F. 1969:
Fadenalgenbekämpfung in Forellenteichen, *Allgem. Fischereizeitung*, 94, 354-355
- JEANJEAN, R., BLASCO, F. & GAUDIN, C. 1971:
L'absorption des ions arseniate par les *Chlorelles*, *Comptes Rendus Acad. Sc. Paris*, t 272, 64-67
- JENSEN, A., RYSTAD, B. & SKOGLUND, L. 1972:
The use of dialysis culture in phytoplankton studies, *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 8, 241-248

- JENSEN, A., RYSTAD, B. & MELSOM, S. 1974:
Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. I. The tolerance of three algal species to zinc in coastal sea water, *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 15, 145-157
- JENSEN, S. & JERNELÖV, A. 1969:
Biological methylation of mercury in aquatic organisms, *Nature*, 223, 753-4
- JERNELÖV, A. 1970:
Release of methyl mercury from sediments with layers containing inorganic mercury at different depths, *Limnol. Oceanogr.*, 15, 956-58
- JERNELÖV, A. 1972:
Factors in the transformation of mercury to methyl mercury, in: *Environmental Mercury Contamination*, R. Hartung u. D. B. Dinman (Hrsg.), Ann Arbor Science Publ. p. 167-172
- JOHNELS, A. G. & WESTERMARK, T. 1969:
Mercury contamination of the environment in Sweden, pp. 221-244, in: *M. W. Miller u. G. Berg (Hrsg.): Chemical Fallout*, Charles Thomas Publ. Springfield, Illinois
- KAMP-NIELSEN, L. 1971:
The Effect of Deleterious Concentrations of Mercury on the Photosynthesis and Growth of *Chlorella pyrenoidosa*, *Physiol. Plant.*, 24, 556-561
- KANAZAWA, T. & KANAZAWA, K. 1969:
Specific inhibitory effect of copper on cellular division in *Chlorella*, *Plant & Cell Physiol.*, 10, 495-502
- KLEIN, D. H. & GOLDBERG, E. D. 1970:
Mercury in the marine environment, *Environ. Sci. and Tech.*, 4, 765-8
- KNAUER, G. A. & MARTIN, J. H. 1973:
Seasonal variations of cadmium, copper, manganese, lead and zinc in water and phytoplankton in Monterey Bay, California, *Limnol. Oceanogr.* 18, 597-604
- KURAMITSU, H. K. 1968:
Mercury(II) stimulation of malate dehydrogenase activity, *J. biol. Chem.* 243, 1021-1061
- KURLAND, L., FARO, S. & SIEDLER, H. 1960:
Minamata disease, *World Neurol.*, 1, 320-325
- LAUGH, E. P. 1934:
Retention of dichromate by glassware, *J. Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.)* 6(2), 111-112
- LUNDEGARDH, H. 1960:
Amion respiration. in: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, 12(2), 185-233
- MANCY, K. H. 1972:
Copper toxicity to fishes in natural waters, Progress Report FWQA 14-12-591

- MANDELLI, E.F. 1969:
The inhibitory effects of copper on marine phytoplankton, *Contr. Mar. Sci.*, 14, 47-57
- MARVIN, K.T., LANSFORD, L.M. & WHEELER, R.S. 1961:
Effects of copper ore on the ecology of a lagoon, *U.S. Fish Wildlife Serv. Fish. Bull.*, 61, 153-160
- MAYZAUD, P. & MARTIN, J.L.M. 1975:
Some aspects of the biochemical and mineral composition of marine plankton, *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 17, 297-310
- MITCHELL, P. 1965:
Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation *Biol. Rev.*, 41, 445
- MORRIS, A.W. 1971:
Trace Metal Variations in the Sea Water of the Menai Straits caused by a Bloom of *Phaeocystis*, *Nature*, 233, 427-8
- MORRIS, A.W. 1974:
Seasonal Variation of Dissolved Metals in Inshore Waters of the Menai Straits, *Mar. Poll. Bull.*, 5, 54-59
- MORRIS, O.P. & RUSSELL, G. 1970:
Copper tolerance in the marine fouling alga *Ectocarpus siliculosus*, *Nature*, 228, 288-9
- MORRIS, O.P. & RUSSELL, G. 1973:
Effect of Chelation on Toxicity of Copper, *Mar. Poll. Bull.*, 4, 159-60
- MOUNT, D.J. 1966:
Air Wat. Pollut. Ind. J., 10, 49-56
- PERCIVAL, E. & McDOWELL, R.H. 1967:
Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. London, Academic Press
- RATHSACK, R. & SACHERT, H. 1969:
Zur Verteilung von Kupfer in *Nitella*-Zellen, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 82, 499-504
- RILEY, J.P. & ROTH, J. 1971:
The distribution of trace elements in some species of phytoplankton grown in culture, *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 51, 63-72
- SCHAEDEL, M. & JACOBSON, L. 1967:
Ion absorption and retention by *Chlorella pyrenoidosa*. III. Selective accumulation of rubidium, potassium and sodium, *Plant Physiol.*, 42, 953-958
- SCHOU, S.A. 1954:
Kobberindholdet i Destilleret Vand., *Arch. Pharm. Chemi.*, 61, 524-549
- SHIEH, Y.J. & BARBER, J. 1973:
Uptake of mercury by *Chlorella* and its effect on potassium regulation *Planta*, 109, 49-60

- SKAAR, H., RYSTAD, B. & JENSEN, A. 1974:
The Uptake of ^{63}Ni by the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Physiol. Plant.*, 32, 353-58
- SLOWEY, J. F., JEFFREY, L. M. & HOOD, D. W. 1967:
Evidence for organic complexed copper in sea water, *Nature*, 214, 377-8
- SOEDER, C. J., SCHULZE, G. & THIELE, D. 1967:
Der Einfluß verschiedener Kulturbedingungen auf das Wachstum von *Chlorella*, *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 33(2) p. 154ff.
- STEEMANN NIELSEN, E., KAMP-NIELSEN, L. & WIUM-ANDERSEN, S. 1969:
The Effect of Deleterious Concentration of Copper on the Photosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa*, *Physiol. Plant.*, 22, 1121-1133
- STEEMANN NIELSEN, E. & KAMP-NIELSEN, L. 1970:
Influence of Deleterious Concentration of Copper on the Growth of *Chlorella pyrenoidosa*, *Physiol. Plant.*, 23, 828-840
- STEEMANN NIELSEN, E. & WIUM-ANDERSEN, S. 1970:
Copper ions as poison in sea and freshwater, *Mar. Biol.*, 6, 93-97
- STEEMANN NIELSEN, E. & WIUM-ANDERSEN 1971:
The Influence of Cu on Photosynthesis and Growth in Diatoms, *Physiol. Plant.*, 24, 480-84
- STEWART, J. 1963:
Chelation in the absorption and translocation of mineral elements, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 14, 295-310
- STRICKLAND, J. D. H. & PARSONS, T. R. 1968:
A Practical Handbook of Seawater Analysis. *Fish. Res. Board Can. Bull.* 167, pp. 311
- SUGIYAMA, H. 1971:
Utilization of micro-green algae for treatment of industrial wastes or polluted water. 3. Resistance of live *Chlorella* in polluted water to toxicity of some heavy metals, *Eisei Kagaku*, 17(2), 75-83; *Ref. Chem. Abstr.*, 75, p. 1579 Nr. 112647 W
- WHITTON, B. A. 1967:
Studies on the Growth of Riverain *Cladophora* in Culture, *Arch. Mikrobiol.*, 58, 21-29
- WHITTON, B. A. 1968:
Effect of light on toxicity of various substances to *Anacystis nidulans*, *Plant & Cell Physiol.*, 9, 23-26
- WHITTON, B. A. 1970:
Toxicity of zinc, copper and lead to Chlorophyta from flowing waters, *Arch. Mikrobiol.*, 72, 353-360
- WILLIAMS, P. M. 1969:
The association of copper with dissolved organic matter in seawater, *Limnol. Oceanogr.*, 14, 156-58

WIUM-ANDERSEN, S. 1974:

The Effect of Chromium on the Photosynthesis and Growth of Diatoms and Green Algae, *Physiol. Plant.*, 32, 308-310

ZIRINO, A. & HEALY, M.L. 1970:

Inorganic Zinc Complexes in Seawater, *Limnol. Oceanogr.*, 15, 956-58

ZIRINO, A. & YAMAMOTO, S. 1972:

A pH-dependent model for the chemical speciation of copper, zinc, cadmium and lead in seawater, *Limnol. Oceanogr.*, 17, 661-671

Dieter Löbe
2800 Bremen
Arnold-Böcklin-Str. 18